



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MITIYO FUKUDA MIYAOKA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS FUNGOS DO GÊNERO *Rhizopus*
spp NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS COM AÇÃO
ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS**

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MITIYO FUKUDA MIYAOKA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS FUNGOS DO GÊNERO *Rhizopus*
spp NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS COM AÇÃO
ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Michele Rigon Spier

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar meu trabalho e poder concluir mais uma meta.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade e pela orientação para concretizar mais uma formação acadêmica, além da força e apoio dados durante este trabalho.

À Professora Dr^a Michele Rigon Spier, pela paciência e amizade, que me ajudou muito na co-orientação desta dissertação.

A Prof. Charles Haminiuk (UTFPR, Campo Mourão), pela ajuda na identificação das biomoléculas.

Aos professores do programa: Prof^a. Dr^a Adenise L. Woiciechowski, Prof^a. Dr^a Adriane P. B. Medeiros, Prof^o. Dr. Júlio C. Carvalho, Prof^o. Me. Luiz Alberto Junior Letti, Prof^a. Dr^a Luciana P.S. Vandenberghe e Prof^a. Dr^a Vanete T. Soccol, pelo estímulo, apoio, e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos alunos de iniciação científica Lohana Renoste Silva e Giovanni Razera pela colaboração prestada durante este trabalho.

Aos amigos da pós-graduação Alessandra Novak, Denise N. X. Salmon, Francisco M. Vitola, Mara E. Matos, Maria Rosa Prado, Michelle Tanoue, Sidnei E. Bordignon, Juliana Oliveira, pelo apoio nos momentos de dificuldade e alegria, e por dividir seus conhecimentos.

Aos amigos e colegas do LPB-I e LPB-II: Ricardo Cancio, Cristine Rodrigues, Valesca Weingartner, Suzan C. Rossi, André Melo, Gustavo Halfen, Carol Tiemi, Vanessa Ghighi, Eduardo Sidney, Ryu Masaki, Leandro Freire, Larissa Staack, Priscila Zanette de Souza, Susan Karp e Franciele Goelzer, Mário Bier, Denise Kunitani, Fernanda Vasconcelos.

E aos amigos e colegas que aqui não citei por serem tantos que trabalharam e que conviveram, e os que ainda convivem comigo nos Laboratórios LPB I e LPB II, e ao pessoal da coordenação e da pós-graduação.

Em especial aos amores da minha vida: João, Jéssica e Larissa, pela paciência e compreensão. É a minha mãe e meu pai (in memoriam) pela ajuda e incentivo acadêmico.

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi testar diferentes linhagens fúngicas do gênero *Rhizopus* sp. em diferentes substratos, dentre eles a soja. 17 linhagens do gênero *Rhizopus* sp. foram selecionadas para estudos por fermentação no estado sólido. Durante o processo de fermentação no estado sólido utilizando as linhagens foram realizadas análises de quantificação de atividade antioxidante pelo método de DPPH, degradação de fator antinutricional pela determinação de atividade de fitases e atividade proteolítica. Dentre as 17 linhagens, duas linhagens *Rhizopus* LPB-R.5 e LPB-R.6 apresentaram grande potencial para a produção de substâncias antioxidantes durante a fermentação. Os processos de fermentação FES e FSm utilizando diferentes substratos foram estudados. Estudos cinéticos do processo de FES foram realizados com misturas de substratos: mistura de grãos de soja e arroz integral, mistura de soja e milho, as quais foram comparadas com os resultados das fermentações realizadas somente com a soja como substrato. A quantificação de compostos antioxidantes bem como a identificação da natureza destas substâncias produzidas durante a fermentação também foram realizadas. O maior incremento de compostos fenólicos foi observado após 60 horas de FES utilizando a linhagem *Rhizopus* LPB-R.05. As substâncias antioxidantes produzidas durante a fermentação no estado sólido foram identificadas: ácido gálico, ácido ferrúlico, rutina, miricetina, ácido trans-cinâmico, quercetina e caempferol. A substância antioxidante produzida em maior concentração foi o ácido trans-cinâmico (124,7 mg/L) em fermentação de soja e (103,3 mg/L) em FES utilizando mistura de soja e arroz por *Rhizopus* LPB-R.05. Além destas substâncias foram identificadas e quantificadas as isoflavonas genisteína e daidzeína.

PALAVRAS-CHAVE: soja, arroz integral, *Rhizopus* spp., antioxidante, fermentação.

ABSTRACT

The objective of this work was to test different fungi strains of the genus *Rhizopus* sp. in different substrates, including soybeans. 17 strains of the genus *Rhizopus* sp. were selected for further by tests in solid state fermentation. These analyzes were performed to quantify the antioxidant activity by DPPH method, degradation of a antinutritional factor by activity phytase assay and proteolytic activity. Among the 17 strains, two strains (*Rhizopus* LPB-R.05 and *Rhizopus* LPB-R.06) showed the greatest potential for the production of antioxidants substances during fermentation were performed FES and FSm. Kinetic studies were performed with substrate mixtures as follow: raw rice and soybean; corn and soybean. Those fermentations were compared to kinetics with soybean as only substrate. Antioxidant activities were quantified and different antioxidants were identified. The greatest increment on phenolic compounds concentration was observed after 60 hours of SSF, using *Rhizopus* LPB-R.05 strain. The follow antioxidants substances were identified during solid state fermentation: gallic acid, ferrulic acid, rutin, miricetin, trans-cinnamic acid, quercetin and kaempferol. The antioxidant substance produced in higher concentration was trans-cinnamic acid (124.7 mg/L) in soy fermentation and (103.3 mg/L) in the mixture soy and raw rice fermented by *Rhizopus* LPB-R. Besides these substances were identified and quantified isoflavones genistein and daidzein.

KEYWORDS: soybean, raw rice, *Rhizopus spp.*, antioxidant, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura microscópica do fungo do gênero <i>Rhizopus</i> sp. (A) e estágios de seu crescimento e reprodução (B)	22
Figura 2. Imagem do fungo <i>Rhizopus</i> sp. A) Imagem microscópica do micélio e da formação do corpo de reprodução com os esporangiósporos; B) Linhagem mantida em tubo de ensaio inclinado contendo meio de cultivo.	34
Figura 3. Esquema com as diferentes categorias de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, com destaque para os flavonóides e fenólicos estudados no presente trabalho de pesquisa.	38
Figura 4. Esquema da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor fenilalanina (aminoácido) necessário para ocorrer a biossíntese de trans-cinâmico pelos vegetais.	41
Figura 5. Esquema das etapas de síntese de flavonoides em plantas. Nomes das enzimas estão abreviadas da seguinte forma: PAL (fenilalanina ammonia liase), C4H (cinamato-4-hidroxilase), 4CL (4-cumaril-CoA-ligase), CHS (chalcone sintase), CHI(chalcon)	42
Figura 6. Biossíntese heteróloga de flavonoides nos microrganismos. A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) também pode utilizar o aminoácido tirosina como substrato.....	43
Figura 7. Esquema das principais etapas do processo de fermentação utilizando diferentes substratos e cepas de <i>Rhizopus</i>	57
Figura 8. Etapas do preparo do inóculo e contagem.....	58
Figura 9. Preparo do substrato com 100 g da amostra	59
Figura 10. Imagem dos sobrenadantes obtidos a partir dos extratos alcoólico das amostras fermentadas FES. Em cada frasco estão as amostras de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de fermentação, respectivamente.	78
Figura 11. Dessecador (A) e bandeja com FES de; <i>Rhizopus</i> sp.- LPB-R.05. (B) Imagem da FES de 36 horas em grãos de soja pela mesma linhagem fúngica.....	79
Figura 12. Resultados de concentração inibitória (IC ₅₀ , em mg/mL) das amostras fermentadas por <i>Rhizopus</i> sp.- LPB-R.05 em grãos de soja conduzidas em bandejas dentro de dessecador incubado em estufa bacteriológica.	80

Figura 13. Resultados de concentração inibitória (IC ₅₀ , em mg/mL) das amostras fermentadas por <i>Rhizopus sp.</i> - LPB-R.05 em grãos de soja conduzidas em bandejas incubadas em estufa bacteriológica.....	81
Figura 14. Atividade de fitase (U/gbs) e o incremento da atividade de fitase em FES por linhagens de <i>Rhizopus spp.</i> em grãos de soja como substrato.	82
Figura 15. Resultados da atividade proteásica nas FES por <i>Rhizopus</i> em grãos de soja como substrato	84
Figura 16. Comparação da FES com 5 linhagens selecionadas de <i>Rhizopus sp.</i> em diferentes substratos.	88
Figura 17. A atividade antioxidante analisado pelo método de DPPH expressa em (índice IC ₅₀ em mg/ml) de extratos obtidos pelas linhagens <i>Rhizopus LPB-R.05</i> e <i>Rhizopus LPB-R.06</i> em FES.....	89
Figura 18. Imagem das FSm por <i>Rhizopus LPB-R.05</i> A) extrato aquoso de soja; (B) crescimento do micélio de 24 h e (C) crescimento de micélio com 72 h de fermentação.	90
Figura 19. Produção de atividade antioxidante expressa em IC ₅₀ de FES (48 h de fermentação) e FSm (96 h de fermentação) pelas linhagens de <i>Rhizopus LPB-R.05</i> e <i>Rhizopus LPB-R.06</i> utilizando diferentes substratos.....	91
Figura 20. Resultados da atividade antioxidante de extrato alcóolico pelo método de DPPH das amostras de fermentado com <i>Rhizopus LPB-R.05</i> e <i>Rhizopus LPB-R.06</i> em substratos com soja e arroz integral e soja com milho ao longo do tempo de fermentação	93
Figura 21. Resultados da comparação da produção de antioxidantes nas amostras de soja e soja + arroz integral fermentados em FES por <i>Rhizopus LPB-R.05</i> em 72 h de fermentação.	96
Figura 22. Resultados da atividade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso dos fermentado de soja e soja mais arroz integral, das amostras (0h) e fermentadas (72h) comparadas com o padrão de BHA:	98
Figura 23. Atividade antioxidante expressa em TEAC (μmol trolox/gbs) obtida pelo método de ABTS das amostras fermentadas com soja e fermentadas com soja e arroz por <i>Rhizopus LPB-R.05</i>	100
Figura 24. Resultados de concentração de compostos fenólicos nos extratos alcoólicos e aquosos ao longo dos tempos de fermentação 0, 24, 48, 60 e 72 h de	

fermentação por <i>Rhizopus</i> LPB-R.05 em mistura soja (S) + arroz integral (AI), e soja (S).	101
Figura 25. Resultados de atividade antioxidante obtida pelo método de DPPH expresso em IC ₅₀ e concentração de compostos fenólicos nos extratos alcoólicos das amostras de soja e mistura de soja + arroz fermentada com <i>Rhizopus</i> LPB-R.05	103
Figura 26. Comparação dos resultados de atividade antioxidante pelo método de DPPH expresso em IC ₅₀ e pelo método de compostos fenólicos. Amostras de soja e mistura de soja + arroz fermentada com <i>Rhizopus</i> LPB-R.05, extraídas com água ultrapura.	103
Figura 27 Produção de isoflavonas(µg/g de fermentado seco), durante as FES de soja e mistura de soja + arroz integral pela linhagem <i>Rhizopus</i> LPB-R.05.....	106
Figura 28. Média dos resultados das análises de açúcares totais (g/L) e açúcares redutores (g/L) nas FES conduzidas com mistura de soja + arroz integral por <i>Rhizopus</i> LPB-R.05	106
Figura 29. Comparação dos resultados das concentrações de açúcares totais e açúcares redutores nas amostras fermentadas de soja por <i>Rhizopus</i> LPB-R.05 ...	107
Figura 30. Aumento da formação de biomassa (g ergosterol/gbs) do fungo <i>Rhizopus</i> LPB-R.05 em FES utilizando a mistura de substratos soja + arroz integral, comparadas ao produção de isflavonas, antioxidante e compostos fenólicos	108
Figura 31. Evolução da formação de biomassa(g/gbs) de <i>Rhizopus</i> LPB-R.05 durante a FES de soja comparadas ao produção de isoflavonas, antioxidante e compostos fenólicos.....	110
Figura 32. Quantificação e identificação por HPLC dos compostos fenólicos e flavonóides e respectivas concentrações (mg/L) em extrato etanólico de fermentado de grãos de soja por <i>Rhizopus</i> LPB-R.05. (A) 0 h; (B) 40 h e (C) 72 h de fermentação.	113
Figura 33. Quantificação e identificação por HPLC dos compostos fenólicos e flavonóides e respectivas concentrações (mg/L) em extrato etanólico de fermentado de grãos de soja e arroz integral por <i>Rhizopus</i> LPB-R.05. (A) 0 h; (B) 40 h e (C) 72 h de fermentação.	115
Figura 34. Resultados da identificação e concentração dos compostos polifenóis (fenólicos + flavonoides) na amostra do extrato etanólico do fermentado por <i>Rhizopus</i> LPB-R.06 em soja + arroz integral em 72h de fermentação.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos aminoácidos essenciais em grãos de soja e produtos relacionados (mg/100g proteínas).....	24
Tabela 2. Substâncias bioativas presentes em alguns alimentos e seus benefícios.	28
Tabela 3. Os principais componentes dos cereais	29
Tabela 4. Alguns compostos antioxidantes biotransformados durante a fermentação por fungos	39
Tabela 5. Compostos antioxidantes identificados em soja e fermentados de soja e arroz integral	45
Tabela 6. Patentes protegidas relacionadas ao presente trabalho de pesquisa	49
Tabela 7. Substratos utilizados para fermentações.....	55
Tabela 8. Delineamento experimental 2^2 (2 fatores, 2 níveis) e 3 pontos centrais apresentando as variáveis independentes amostra (g) e tempo de extração (h) na resposta %de atividade antioxidante. Os valores -1, 0, +1 representam os níveis das variáveis codificadas e entre parênteses os valores decodificados.	62
Tabela.9. Atividade antioxidante da fermentação de diferentes cepas de diferentes extratos para seleção de linhagens de <i>Rhizopus</i>	76
Tabela 10. Resultados do delineamento experimental para o estudo da influência da extração de compostos antioxidantes da amostra fermentada na % de atividade antioxidante. Variáveis: proporção de amostra (g) e tempo de extração (h) para a respota atividade antioxidante.....	77
Tabela 11. Produção de fitases fúngicas por FES	83
Tabela 12. Produção de proteases fúngicas por FES relatadas na literatura	85
Tabela 13. Resultados de IC_{50} mg/mL do extrato com etanol 70% e água de amostras fermentadas em FES com diferentes substratos utilizando diferentes linhagens de <i>Rhizopus</i>	86
Tabela 14. Produção de atividade antioxidante em fermentados de soja com fungos, descritos na literatura.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzil-tiazolina-6-sulfônico)
AI	Arroz integral
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARP	Poder anti-radical livre
BHA	Butil hidroxianisol
C	Concentração
CDV	Doenças Cardiovasculares
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
PDA	Potato dextrose ágar (Ágar de batata dextrosado)
Detector PDA	Detector de Arranjo de Diodos
Desv pad	Desvio padrão
DNS	3,5-ácido dinitrosalicílico
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EC	Concentração eficiente
FAO	Food and Agriculture Organization
FES	Fermentação no Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
FDA	Food and Drug Administration
GAE	Equivalente em ácido gálico
GRAS	Generally Regarded as Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
IBD	Instituto Biodinâmico
IC	Concentração inibitória
INCOPA	Indústria e Comércio de Papéis
M	Massa
MUCL	Mycothèque de Université Catholique de Louvain (Bélgica)
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (EUA)
P.A	Para análise

PVDF	Fluoreto Polivinidileno
pH	Potencial hidrogeniônico
R	<i>Rhizopus</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox)
TNT	Tecido flexível e poroso, constituído de véu ou manta de fibras
T0	Tempo inicial
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7 tetramethylchroman-2-carboxylic acid (marca registrada da LaRoche)
S	Soja
SEAB	Secretaria da Agricultura e Abastecimento
USA	Estados Unidos da América
USDA	United States of America (Department of Agriculture)
UV_VIS	Luz ultravioleta e Luz visível
V	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
m/v	massa/volume
h	hora
mg/mL	miligrama por mililitro
mg/gbs	miligrama por grama na base seca
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
mM	milimolar
mL	mililitro
nm	nanometro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NaCO ₃	carbonato de cálcio
U/gbs	unidade por grama na base seca
U/gbu	unidade por grama na base úmida
U	unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Microrganismos	20
3.2. Fungos filamentosos.....	20
3.2.1. Classificação dos fungos do gênero <i>Rhizopus sp.</i> :.....	22
3.3. Cereais e leguminosas utilizados na fermentação.....	22
3.3.1. Soja	22
3.3.2. Soja e as diferenças de soja orgânica.....	26
3.3.3. Alimentos Funcionais	27
3.3.4. Benefícios de Algumas Substâncias Bioativas Presentes em Alguns Alimentos	27
3.3.5. Cereais.....	28
3.4. Produtos Obtidos por Fermentação.....	30
3.4.1. Fermentação no Estado Sólido (FES).....	30
3.4.2. Fermentação Submersa (FSm).....	31
3.4.3. Produtos Fermentados e Derivados à Base de Soja.....	32
3.4.4. Tempeh, produto fermentado de soja por <i>Rhizopus oligosporus</i>	34
3.5. Compostos Bioativos	36
3.5.1. Substâncias Antioxidantes	36
3.5.2. Compostos Fenólicos	39
3.5.3. Biossíntese de Compostos com Ação Antioxidante (flavonóides e fenólicos)	40
3.5.4. Metabolismo de produção de compostos flavonóides em vegetais.....	42
3.5.5. Metabolismo de produção de compostos flavonóides por microrganismos	43
3.5.6. Isoflavonas.....	44
3.5.7. Compostos antioxidantes identificados da soja.....	45
3.5.8. Patentes encontrados em pesquisa	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1. Microrganismos.....	54

4.2. Substratos Utilizados para as Fermentações	54
4.3. Representação esquemática das etapas do trabalho.....	56
4.4. Preparo do Inóculo.....	58
4.5. Preparo do Substrato/grãos de soja.....	58
4.6. Seleção de Linhagens de <i>Rhizopus spp.</i>	59
4.7. FES em Bandejas Tipo Peneira	60
4.8. Fermentação Submersa (FSm) ou Líquida	61
4.9. Determinação da Atividade Antioxidante	62
4.9.1. Extração dos produtos da fermentação	62
4.9.1.1. Estudo da influência da proporção de amostra fermentada e do tempo de extração na determinação da atividade antioxidante em FES	62
4.9.1.2. Etapas posteriores à FSm	63
4.9.1.3. Extração sólido-líquido (FES)	63
4.9.2. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH.....	63
4.9.3. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS	65
4.9.4. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu	66
4.9.5. Determinação da Atividade de Fitase	68
4.9.6. Determinação da Atividade de Protease.....	68
4.9.6.1. Metodologia para extração da amostra	69
4.9.6.2. Determinação da Atividade Proteásica	69
4.9.7. Determinação de Isoflavonas.....	70
4.9.8. Determinação Indireta de Biomassa pela Quantificação de Ergosterol ..	71
4.9.9. Determinação de Açúcares.....	72
4.9.9.1. Determinação de Açúcares Totais.....	72
4.9.9.2. Determinação de Açúcares Redutores	73
4.9.10. Identificação e Quantificação de Compostos Antioxidantes.....	73
4.9.10.1. Preparo das amostras	73
4.9.10.2. Identificação e quantificação por HPLC por arranjo de diodo	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1. Seleção de microrganismos e substratos para produção de substâncias com ação antioxidante	75
5.2. Fermentação com o fungo <i>Rhizopus</i> para verificar a influência da extração	77
5.2.1. Influência da extração das amostras fermentadas	77

5.2.2. Produção de Antioxidantes em FES de Grãos de Soja por <i>Rhizopus oligosporus</i> NRRL 2710.....	79
5.2.3. Resultados da Produção de Fitase por linhagens de <i>Rhizopus</i> sp.	81
5.2.4. Resultados da Produção de Proteases durante a FES por linhagens de <i>Rhizopus</i>	84
5.2.5. Seleção do Melhor Substrato Para a Produção de Antioxidante	85
5.2.6. Avaliação da Mistura de Cereais na Produção de Substâncias Antioxidantes por FES utilizando Cepas de <i>Rhizopus</i> Pré-selecionadas	86
5.2.7. Fermentação no Estado Sólido (FES) com Diferentes Substratos	88
5.2.8. Estudo de Fermentação Submersa (FSm) com Extratos aquoso de diferentes Substratos	90
5.3. Cinética Final do Processo Fermentativo com as Melhores Linhagens Produtoras de Substâncias com Atividade Antioxidante	93
5.3.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH.....	95
5.3.2. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS	99
5.3.3. Determinação de Compostos Fenólicos	101
5.3.4. Determinação da Concentração de Isoflavonas	104
5.3.5. Determinação de Açúcares Totais e Redutores.....	106
5.3.6. Determinação de Biomassa (Ergosterol)	108
5.3.7. Identificação e Quantificação dos Compostos Antioxidantes	112
6. CONCLUSÕES	118
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	120
REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICES.....	148
Apêndice 1 – Análises Estatísticas	148
Apêndice 2 – Curvas Padrões.....	150
Apêndice 3 – Cromatogramas das análises em HPLC (identificação e quantificação de antioxidantes).....	154

1. INTRODUÇÃO

A cultura de soja é uma das mais expressivas em produção e seus derivados no Brasil. A aparição desta leguminosa no Brasil deu-se no início do século XIX (BRANDÃO, 2006), mas o impulso para sua produção ocorreu em meados dos anos 70 devido à incapacidade de suprimento dos Estados Unidos, China e Rússia. Atualmente o Brasil ocupa o posto de segundo maior produtor mundial de soja (CONAB, 2011), perdendo apenas para os Estados Unidos e obteve uma produtividade de 3.106 Kg. ha⁻¹ na safra de 2010/2011, com produção total de 75 milhões de toneladas, evidenciando um aumento de 9,2% em relação à safra anterior (CONAB, 2011) Essa situação, porém irá se reverter nos próximos anos, e o Brasil assumirá o posto de maior produtor mundial de soja (EMBRAPA, 2007).

A instalação de um parque industrial de processamento de soja, de fábrica de máquinas e insumos agrícolas além de incentivos fiscais e disponibilidade de boas condições de solo são fatores que justificaram a expansão da produção da soja primeiramente no sul do país nos anos 60 e 70 e posteriormente nos Cerrados do Brasil Central nos anos 80 e 90 (EMBRAPA SOJA, 2000).

A cultura agrícola dessa leguminosa é atrativa no contexto globalizado, pois é fonte de uma grande variedade de produtos para alimentação humana e animal, como por exemplo, óleo e derivados protéicos tais como farinhas desengorduradas, texturizados, concentrados e isolados protéicos (GENOVESE e LAJOLO, 2001), além de apresentar alto valor nutritivo (GRAU, 2005).

Nos países orientais, a soja é consumida há mais de 2000 anos na forma de alimentos como *nimame* (soja cozida), *edamame* (soja verde e fresca), *tofu*, *kori-tofu* (tofu desidratado), molho de soja (*shoyu*), missô (pasta de soja), *natto* e *tempeh* (FUKUSHIMA e HASHIMOTO, 1980). Mas os consumidores brasileiros associam aos alimentos produzidos a partir da soja um aroma e sabor desagradável conhecido como “*beany flavor*” (Martins, et al., 2002).

Soja é alimento funcional, pois conforme definição apresentada pela Resolução de nº 19, de 30 de abril de 1999 (ANVISA, 2012), a soja apresenta, além das funções nutricionais básicas, quando consumida como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos, fisiológicos ou efeitos benéficos à saúde, além ser segura para consumo sem supervisão médica.

A soja é qualificada como um alimento funcional devido às suas características químicas e nutricionais. Essa leguminosa é composta em média por proteínas (40%), carboidratos, ácidos graxos, vitaminas, cálcio, fósforo além de metabólitos secundários como as substâncias fitoquímicas tais como as isoflavonas, ácido fítico, saponinas e oligossacarídeos (ANDERSON e WOLF, 1995; KWAK *et al.* 2007) e algumas dessas substâncias apresentam poder antioxidante (GENOVESE e LAJOLO, 2001); (MACIEL, 2002).

A identificação de fontes vegetais com capacidade terapêutica é de extrema importância para comunidade científica. Estudos realizados por HASLER (1998) demonstraram que a soja e seus derivados podem ser utilizados de maneira preventiva e terapêutica no tratamento de osteoporose, sintomas da menopausa, câncer e doenças cardiovasculares. O consumo desses produtos que são fontes protéicas e nutritivas é uma alternativa viável para redução no problema da desnutrição, pois são econômicas e estão disponíveis em grande escala no mercado (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

O desenvolvimento de produtos a base de soja com propriedades funcionais se baseia na adição apropriada de derivados de soja, sejam eles isolados proteicos, extratos ou concentrados de soja, pois fornecem alimentos com proteína de boa qualidade e preservam as características físicas e sensoriais do produto tradicional (GENOVESE e LAJOLO, 2001).

Atualmente os microrganismos são muito explorados tanto na área da medicina, alimentos, agricultura, indústria e ambiente. Tanto para produção de medicamentos, alimentos com novos sabores e aromas, e como controles biológicos de pragas (PELCZAR *et al.*, 1996).

Os fungos são utilizados na indústria para produção de produtos biotecnológicos como ácidos orgânicos, enzimas, antimicrobianos, agentes antitumorais e imunomoduladores (SMITH *et al.*, 1983; WAINWRIGHT, 1992). Fungos mais utilizados são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Agaricus*, *Trichoderma*, *Phanerochaete* e leveduras, entre outros fungos (WAINWRIGHT, 1995).

Os cereais constituem 60% da produção mundial dos alimentos em países mais industrializados, mas desta produção 70% é destinado à alimentação animal, ao contrário do que acontece nos países desenvolvidos que pelo menos 68 a 98%

são destinados ao consumo humano (CLAVAN e KADAN, 1989). A fermentação é uma das formas mais antigas e econômicas de produzir e preservar alimentos. (WAINWRIGHT, 1992). Os cereais possuem composição completa de nutrientes necessários a nutrição humana, pois são constituídos de carboidratos (55-75%), proteínas (7-15%), lipídeos (0,50-7%), sais minerais (1-4%) e por oligoelementos.

Os cereais apresentam diversos benefícios ao organismo. Dentre as suas funções estão: função nutritiva, energética e remineralizantes desde que sejam consumidos na forma integral (RAGOT, 1985).

A fermentação no estado sólido (FES) consiste no crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido e úmido com aeração contínua e sem a presença de água livre entre as partículas. A FES é semelhante ao habitat natural de fungos, permitindo o seu crescimento e esporulação (SOCCOL, 1992; 1994; 2003). O processo de fermentação no estado sólido é empregado por algumas indústrias para produção de enzimas, molhos, ácidos e bebidas (RAIMBAULT, 1998). Empregam-se substratos sólidos provenientes de grãos de cereais ou outros vegetais ou resíduos agroindustriais, com ou sem suplementação de nutrientes.

A FES é indicada para vários tipos de substratos sólidos, pois permite alta taxa de concentração do substrato além de reproduzir, de forma semelhante as condições de crescimento de microrganismos tais como fungos. Além disso, pode permitir a geração de produtos com alto valor agregado tais como antibióticos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos, enzimas e ácidos orgânicos (SOCCOL, 1992; 1994).

É comum a aplicação de FES para o cultivo de fungos e produção de metabólitos primários e secundários, sendo que algumas leveduras e bactérias também podem ser cultivadas por esta técnica de fermentação. Como exemplo podemos citar o *Bacillus atrophaeus* foi um grande desafio da FES para produção de esporos com alto rendimento utilizado para bioindicadores e biocontadores de contaminação ambiental (SELLA, 2009), a quantificação e a separação de biomassa (PANDEY, 2003). O resíduo de óleo de sementes de *Guizotia abyssinica*, foi utilizado para FES, com a levedura *Yarrowia lipolytica*, para produção de lipase, onde teve uma boa produção lipásica, devido a composição do substrato (IMANDI, 2010).

O ergosterol é uma medida indireta para indicar o crescimento fúngico, pois tem correlação com a biomassa metabolicamente ativa do fungo, fazendo parte dos componentes da membrana citoplasmática. Vários trabalhos utilizam a quantificação do ergosterol como medida de biomassa fúngica (SEITZ *et al.*, 1977, 1979; RUZICKA *et al.*, 2000). Quando uma biomassa não pode ser separada do substrato utilizado na fermentação, o fungo pode ser monitorado utilizando a medição do componente químico. Assim como a quitina faz parte da parede celular da maioria dos fungos, também pode ser quantificada e relacionada ao crescimento fúngico. O ergosterol é o esteroide predominante nos fungos, e ausentes ou pouco encontrados em plantas superiores (SEITZ, 1979), fazendo este um método recomendado para a quantificação indireta de biomassa fúngica em FES.

O interesse por alto valor nutritivo e funções regulatórias no metabolismo funcional tem incentivado a produção de um alimento fermentado de soja tradicional na Indonésia, o *tempeh*. Este produto fermentado é muito consumido frito e em sopas nas Filipinas e na Malásia, mas pouco encontrado no Japão (MORAIS, 1996). Segundo NAKAJIMA (2005), seu preparo exige o cozimento de grãos de soja, previamente descascados e submetidos a um processo de fervura, e a inoculação com *Rhizopus oligosporus* dos grãos drenados e resfriados.

A produção do fermentado de soja *tempeh* utiliza a técnica de fermentação no estado sólido (FES). Na maioria dos casos, tal técnica possibilita a produção de metabólitos por microrganismos em quantidades superiores quando comparada a fermentação submersa. Além disso, oferece a possibilidade de reaproveitamento de resíduos agroindustriais e consequente redução de custos no processo (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; SOCCOL, 1992; 1994; 2002).

A fermentação da soja com fungos do gênero *Rhizopus* tem contribuído para melhorar o sabor, textura, valor nutritivo da soja (HESSELTINE *et al.*, 1963). Os antioxidantes polifenólicos produzidos pela fermentação da soja têm contribuído muito para prevenir doenças como câncer (intestino, próstata e mama). Conforme MATSUDA *et al.* (1994), estes efeitos anticancerígenos estão relacionados com o alto teor de isoflavonas (OHR, 2002), e ainda a genisteína e daidzeína são efetivas na prevenção da perda óssea (GREENWOOD *et al.*, 2000).

Os fermentados como: *chungkukjang* (similar ao *natto*, fermentado com *Bacillus subtilis*), o *cheonggukjang* (pasta de soja, usada como tempero e base para

o preparo de outros pratos), e *meju* (um fermentado de soja por *Bacillus subtilis* utilizado para o preparo de *doenjang* (pasta apimentada amplamente utilizada nos pratos típicos da coreia)). Esses produtos têm ação antidiabética, reduz a hipertensão e apresenta ação hipercolesterolêmica (YANG, 2009). As substâncias com maior poder de atividade antioxidante em soja são as isoflavonas daidzeína e genisteína, as quais têm relatos de combater o câncer, sintomas de menopausa e doenças do coração (LARREA, 1997).

O FDA autorizou a inclusão de informações nos rótulos dos produtos alimentícios associadas aos benefícios da soja no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, a agência conclui que a proteína de soja presente na dieta alimentar pobre em gorduras saturadas e colesterol pode reduzir o risco de doenças cardíacas coronárias, reduzindo o colesterol no sangue (FDA, 1999).

Assim sendo, o presente trabalho visa à seleção de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* com potencial para fermentar grãos de soja e de outros grãos de cereais buscando aumentar o valor nutricional e funcional desses grãos. Desta forma objetiva-se avaliar a produção de substâncias com atividade antioxidante e identificar a natureza dessas substâncias produzidas durante o processo fermentativo dos diferentes substratos.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a produção de compostos bioativos com ação antioxidante por processo fermentativo utilizando diferentes linhagens de fungos do gênero *Rhizopus* sp. em diferentes substratos, bem como, avaliar o potencial desses fermentados como fonte de matérias primas na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética.

1.2. Objetivos específicos

- Selecionar linhagens de fungos do gênero *Rhizopus* sp. com potencial para a produção de antioxidantes, mais especificamente as substâncias polifenólicas, subclassificações (flavonóides e fenólicos);
- Produzir substâncias com ação antioxidante por fermentação a partir de linhagens do gênero *Rhizopus* previamente selecionadas;
- Produzir e quantificar substâncias antioxidantes no fermentado;
- Quantificar a atividade antioxidante em diferentes substratos;
- Quantificar a evolução da atividade antioxidante em diferentes tempos de fermentação;
- Verificar o melhor método de extração das substâncias antioxidantes produzidas nos fermentados por *Rhizopus* sp.;
- Realizar cinéticas de fermentação das melhores linhagens de *Rhizopus* sp. produtoras de substâncias antioxidantes, avaliando o consumo de açúcares, a formação e crescimento de biomassa, e a produção de antioxidantes ao longo do tempo de fermentação;
- Avaliar a concentração de compostos fenólicos totais produzidos por fermentação por *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710;
- Quantificar e identificar por HPLC, as substâncias antioxidantes produzidas durante FES por *Rhizopus* NRRL 2710.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos

O mundo é habitado por organismos altamente heterogêneos, e dentre os microrganismos de importância biotecnológica, estão divididos em dois grandes grupos, os organismos que estão representados pelos eucariontes como: protozoários, algas, fungos e leveduras (WHITMAN *et al.* 1998); e os procariontes, representados por bactérias e arqueobactérias (TORTORA *et al.*, 2008).

As bactérias, leveduras e fungos podem crescer em substratos sólidos e apresentar diferentes aplicações biotecnológicas para a obtenção de várias biomoléculas de interesse industrial, por meio de técnicas de cultivo como os processos de fermentação no estado sólido (FES) (SOCCOL, 1994). Os fungos filamentosos são os mais facilmente adaptáveis aos processos de fermentação no estado sólido (FES), porque reproduzem algumas condições de seus habitats naturais. Koji e tempeh são produtos orientais fermentados representados como alguns dos produtos mais importantes das aplicações de FES com fungos, koji e meio da enzima concentrada hidrolítica necessária em fases posteriores ao processo da fermentação e tempeh e um alimento indonésio fermentado com *Rhizopus* na soja. A fermentação melhora a qualidade digestiva e degrada compostos não digeríveis e degrada compostos proteicos contido na soja bruta.

2.2. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são eucariontes, formados por hifas, e apresentaram parede célula rígida. Podem ser unicelulares tais como as leveduras que são ovais, e maiores que bactérias ou multicelulares como os fungos filamentosos, que são formados por micélios (TORTORA *et al.*, 2008). Alguns são microscópicos e outras não como os macromicetos (cogumelos) ou fungos que crescem em madeira ou solo (PELCZAR *et al.*, 1996). Os bolores são organismos multicelulares. O corpo ou talo de um fungo filamentoso consiste em um micélio e nos esporos latentes. Cada micélio é constituído por uma biomassa de filamentos denominados hifas. Cada hifa tem em torno de 5 a 10 µm de largura e é formada por uma reunião de muitas

células (PELCZAR *et al.*,1996). A parede rígida da hifa é composta por quitina, celulose e glicana (TORTORA *et al.*, 2008). O crescimento dos fungos geram micélios brancos que se formam em volta de todo o substrato, de onde obtém alimentos absorvendo os nutrientes de matéria orgânica de seu ambiente ou do seu hospedeiro (TORTORA *et al.*, 2008).

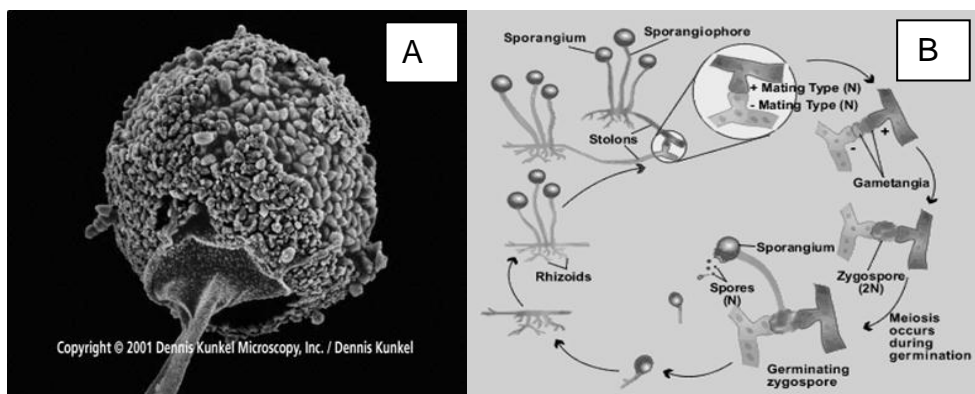
Os fungos na biotecnologia tradicional estão sendo muito utilizado na produção de aromas para alimentos, ácido cítrico e antibiótico (EVERLEIGH, 1981), além de ser usado industrialmente na produção de ácidos orgânicos (SMITH, *et al.*,1983). Certos fungos também são utilizados para melhorar o sabor de alimentos, como a do queijo. Recentemente tem sido de grande importância o surgimento de novos agentes farmacológicos, antitumorais e imunomoduladores (WAINWRIGHT, 1992). Os bolores têm grande valor econômico: são usados para produzir antibióticos, molhos, queijos e outros produtos, contudo são responsáveis pela deterioração de matéria têxtil, madeira e alimentos, ainda podem causar certas doenças em animais, humanos e plantas (PELCZAR *et al.*, 1996).

Os fungos podem se reproduzir por esporos sexuais ou assexuais (TORTORA *et al.*, 2008). Os esporos sexuais são produzidos como resultado da fusão de duas células reprodutivas, e a formação dos esporos assexuais não envolve a fusão de gametas. Cada talo pode produzir centenas de milhares de esporos assexuais, que são produzidos nas hifas aéreas. Os fungos podem produzir esporos sexuais e assexuais por vários métodos em épocas diferentes, mas as estruturas dos esporos são suficientemente constantes e dessa forma, podem ser usados para identificação e classificação dos fungos (WAINWRIGHT, 1992).

Morfologicamente, essa espécie de fungos apresentam esporangiósporos irregulares e sem estrias independentes das condições de crescimento. Os esporos são pequenos e são originados em rizoides pouco extensos e não ramificados (HESSELTINE, 1966). Em condições ótimas de 42°C e pH 4, ocorre a germinação dos esporos em duas fases: inchaço e protrusão dos tubos germinativos que depende também da fonte de nitrogênio, principalmente dos aminoácidos (MEDWID e GRANT, 1984).

As figuras 1A E 1B apresentam a imagem da estrutura microscópica do fungo *Rhizopus* sp. (A) e os estágios de seu crescimento e reprodução (B).

Figura 1. Estrutura microscópica do fungo do gênero *Rhizopus* sp. (A) e estágios de seu crescimento e reprodução (B)



FONTE: Dennis Kunkel microscopy 2001

FONTE: AL QASIM TRUST, 2012.

2.2.1. Classificação dos fungos do gênero *Rhizopus* sp.

Os fungos do gênero *Rhizopus* sp. são classificados segundo o Reino Fungi, Filo: Zygomycota, Classe: Zygomycetes, Ordem: Mucolares, Família: Mucolaceae, Gênero: *Rhizopus*. Dentre as espécies do gênero *Rhizopus*, tem-se as espécies *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circicans*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus formosa*, *Rhizopus stolonifer*.

As principais vantagens de se utilizar *Rhizopus oligosporus*, que é de fácil manipulação, capaz de crescer em diferentes substratos e produzir grandes rendimentos de bioprodutos. Os fungos do gênero *Rhizopus* são considerados como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela FAO (2011), seguros para uso alimentar (RHANDIR *et al.*, 2004). Este gênero de fungo é comumente utilizado na Ásia para produzir produtos alimentícios, e por sua capacidade de produzir compostos fenólicos (CORREIA *et al.*, 2004; VATTEM *et al.*, 2004; RHANDIR e SHETTY, 2007).

2.3. Cereais e leguminosas utilizados na fermentação

2.3.1. Soja

Soja é um produto de consumo milenar no Ocidente. Em países ocidentais como o Brasil, começou a ser cultivada apenas no final do século XIX (BRANDÃO, 2006). O primeiro registro de cultivo foi realizado no município de Santa Rosa no Rio Grande do Sul (RS) no ano de 1914, porém somente a partir da década de 40, a

soja adquiriu importância econômica merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS (EMBRAPA, 2007). A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) que é cultivada atualmente em vários países não é a mesma variedade que lhe deu origem, pois há variedades modificadas geneticamente ou que foram se adaptando com o ambiente. Plantas oriundas de cruzamentos naturais de duas espécies de soja selvagens foram melhoradas pelos chineses (EMBRAPA, 2004).

O crescimento agrícola no Brasil tem como destaque o cultivo da soja. Registrou-se um aumento na taxa média anual de crescimento da área plantada dessa leguminosa de 3,6% no período 1990-1991 a 2000-2001 para 13,8% entre 2000-2001 e 2003-2004 (CONAB, 2006). O Estado do Paraná apresentou produção de 14.009.435 toneladas de soja aliado a alta produtividade, aproximadamente 3.200 kg/ha (SEAB, 2011).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e é responsável por 24% da oferta global dessa semente, atrás do líder de produção, Estados Unidos. Essa situação, porém irá se reverter nos próximos anos, e o Brasil assumirá o posto de maior produtor mundial de soja, devido às condições climáticas favoráveis, áreas disponíveis para plantio e inovação tecnológica no campo agro-industrial. (EMBRAPA, 2007). A indústria da soja é importante atualmente para a captação de moedas estrangeiras pelas exportações de produtos derivados da soja como farelo, óleo, lecitina, grãos e para o suprimento do mercado interno de óleos comestíveis e concentrados protéicos (FAO, 2011).

Um grão de soja típico possui 35% a 40% de proteína, 15% a 20% de gordura, 10% a 13% de umidade, 30% de carboidratos e aproximadamente 5% de cinzas e minerais (KAGAWA, 1995), sendo que a composição química pode variar com as condições climáticas, localização geográfica, tipos de solo, variedades e práticas agro-econômicas (HORAN, 1974). Segundo LEE e KADER (2000), a quantidade de ácido ascórbico varia com as condições de crescimento e grau de maturação. Para o consumo humano, é interessante que a soja apresente maior teor e melhor qualidade de proteínas, maior teor de aminoácidos sulfurados, menor teor e maior qualidade de óleo (VELHO 1992).

Segundo FRIEDMAN e BRANDON (2001), a germinação do grão de soja tende a aumentar a quantidade de proteínas e reduzir a quantidade de oligossacarídeos não digestíveis.

A porcentagem de lipídios na soja (cerca de 20%) representa o dobro da porcentagem encontrada em outras leguminosas. Segundo LIU (1998), a soja é fonte de ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linoléico e o ácido linolênico que contribui com cerca de 53% do conteúdo total de ácido graxo no óleo presente no grão.

Segundo OLIVEIRA (1981), do ponto de vista nutritivo a soja é fonte de energia, que contém proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas. Devido a esse alto teor nutritivo, vários trabalhos já foram desenvolvidos com o objetivo de estimular o consumo de soja e seus derivados (OLIVEIRA, 1981; SHURTLEFF, 1990). Ainda os produtos de soja são considerados como um bom substituto para proteína animal, pelo seu valor nutricional, exceto pelo alguns aminoácidos, tais como metionina e cisteína que são equivalentes. As proteínas presentes na soja tabela 1 contém a maioria dos aminoácidos essenciais para a alimentação humana (WANG, 2007).

Tabela 1. Composição dos aminoácidos essenciais em grãos de soja e produtos relacionados (mg/100g proteínas)

Aminoácido	Grãos de soja	Farinha de soja	Concentrado de soja	Isolado de soja	Leite de soja	Tofu
Isoleucina	35	46	48	49	46	48
Leucina	79	78	79	82	79	83
Lisina	62	64	64	64	60	61
Metionina	21	26	28	26	16	14
Fenilalanina	87	88	89	92	80	83
Treonina	41	39	45	38	40	40
Triptofano	-	14	16	14	-	-
Valina	37	46	50	50	48	49

FONTE: EUA (2008)

A soja-grão (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence ao mesmo gênero da soja-planta e à mesma família *Fabaceae* (KONOVSKY e LUMPKIN, 1990). As substâncias fenólicas, que possuem potencial antioxidante, são compostos ativos comumente encontrados em vegetais (RHODES, 1996) e que estão presentes na

soja. Esses compostos podem se apresentar na forma livre ou associadas a açúcares e a proteínas. São considerados antioxidantes naturais que evitam a deterioração oxidativa dos alimentos e podem ser utilizados para minimizar os danos oxidativos do organismo animal (MELO e GUERRA, 2002). O consumo de soja aumentou nos países ocidentais devido à importância dessa leguminosa como alimento funcional, propiciando benefícios à saúde e prevenção às doenças crônicas degenerativas, característica consolidada em estudos recentes (PARK *et al.*, 2001).

Durante as últimas décadas, evidências científicas vêm demonstrando que as isoflavonas da soja podem trazer benefícios no controle de doenças crônicas tais como câncer, diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares (ESTEVES e MONTEIRO, 2001),

No Brasil, diferentes cultivares de soja possuem diferenças na concentração de isoflavonas (PARK *et al.*, 2001) que se desenvolvem durante o período de formação da vagem e do grão (WILDMAN, 2001). Os níveis desses compostos polifenólicos são afetados por fatores ambientais como umidade e temperatura em que é realizado o plantio (CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 1998) e dependem da parte morfológica da leguminosa (cotilédone, hipocótilo e casca), da variedade (fatores genéticos) (TSUKAMOTO *et al.*, 1995; CHOI *et al.*, 1996).

As aminas presentes em grãos de soja são putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina, sendo a última encontrada em maior quantidade (GLÓRIA *et al.*, 2005). As aminas atuam como reservas de nitrogênio. São substâncias naturais de crescimento de microrganismos e de vegetais, como hormônios ou fatores de crescimento, acelerando o processo metabólico, principalmente na regulação da secreção gástrica e na contração e relaxamento do músculo liso. São biomoduladoras e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (SMITH, 1980-1981; STRATTON *et al.*, 1991; BAUZA *et al.*, 1995).

Devido às suas características biológicas, a soja é classificada como um alimento funcional que, segundo ROBERFROID (2002), é aquele que pode afetar de forma benéfica uma ou mais funções alvo no corpo humano, além de possuir efeitos nutricionais adequados e seja relevante tanto para o bem-estar e saúde quanto para a redução de risco de uma doença. A dieta alimentar contendo soja pode diminuir risco de doenças como o da osteoporose, doenças cardiovasculares e redução das

doenças de câncer de mama, próstata e cólon (ROBERFROID *et al.*, 2010; FRIEDMAN e BRANDON 2001).

A soja é composta por diferentes tipos de isoflavonas na forma de β -glicosídeos conjugados (daidzina, glicitina e genistina), os derivados malonil- β -glicosídeos (malonildaizina, malonilglicitina e malonilgenistina) e as agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína).

2.3.2. Soja convencional e as diferenças de soja orgânica

A cultura orgânica evita o uso de fertilizantes e pesticidas químicos nos cultivo de plantações. Esta agricultura valoriza o uso de matéria orgânica a fim de desenvolver uma agricultura equilibrada, além de economicamente viável (SOUZA, 2000). Os princípios da agricultura orgânica foram desenvolvidos na Inglaterra a partir de 1925 e nos Estados Unidos a partir de 1940. A base do cultivo orgânico é a redução do uso de produtos químicos e valorização de processos biológicos e vegetais nos sistemas agrícola, com emprego do uso da adubação orgânica de origem animal ou vegetal, plantio consorciado, rotação de culturas e controle biológico de pragas (SOUZA, 2000).

Segundo IBD (Instituto biodinâmico), que certificam alimentos orgânicos no Brasil, o mercado brasileiro teve taxas de crescimento de 30% e 50% ao ano, e tem a segunda maior área de agricultura orgânica do mundo (SONATI e AFFONSO, 2007). Atualmente o Paraná é um dos maiores produtores de produtos orgânicos do País (EMATER-PR, 2003). Na safra de 2002/2003, a soja ocupou 5.890ha, sendo 70% da área localizada no Oeste e Sudeste do Paraná. No caso da soja orgânica, mesmo a produtividade sendo menor que a soja convencional, a rentabilidade é 31% maior (EMBRAPA, 2005). Existem pessoas que questionam as vantagens nutricionais destes alimentos orgânicos, porque em termos de carboidratos, proteínas e gorduras, não há diferença, mas os estudos comprovam que vegetais cultivados sem agrotóxicos desenvolvem defesas naturais e aumentam a disponibilidade de micronutrientes (SONATI e AFFONSO, 2007).

Segundo a LEI nº 10.831 do Ministério da Agricultura (ano 2003), “a finalidade de um sistema de produção orgânica é a oferta de produtos saudáveis isentos de contaminantes intencionais; a preservação da diversidade biológica dos

ecossistemas naturais; promover um uso saudável do solo, da água e do ar, e reduzir ao mínimo todas as formas de contaminação”.

Nos últimos anos, tem se observado uma expansão significativa do mercado de produtos orgânicos. O desenvolvimento sócio-cultural das sociedades modernas tem feito emergir novos padrões de consumo no mercado de alimentos. A conscientização da necessidade de preservação do meio ambiente e as crescentes exigências por uma alimentação saudável e com qualidade têm potencializado a produção orgânica/ecológica. Os altos custos da agricultura convencional têm levado vários agricultores a repensar sua forma de produzir. Muitos pequenos produtores familiares, excluídos do atual modelo agrícola dominante, têm encontrado nas técnicas e princípios da agricultura orgânica uma forma de viabilizar economicamente sua pequena escala de produção, permitindo, assim, um padrão de vida melhor no campo (www.sober.org.br/palestra/12/05O299.pdf)

2.3.3. Alimentos Funcionais

A ANVISA define funcional como “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como alimentação normal, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos que ajudam no benefício à saúde, devendo ser seguro para consumo sem acompanhamento médico, fazendo parte das nossas refeições diárias (ANVISA, 2012). Os efeitos são positivos quando consumido estes alimentos funcionais, entre estes: “aumento da defesa orgânica, efeitos antioxidantes, prevenção ou recuperação de doenças específicas, melhoria de condições físicas ou mentais, redução da velocidade do envelhecimento” (SONATI e AFFONSO, 2007).

Os antioxidantes removem os radicais livres, e tem a função de prevenção dos processos oxidativos e degenerativos que ocorrem no organismo. Os principais compostos são: vitamina C, vitamina E, carotenóides (precursores da vitamina A, flavonóides, selênio, isoflavonas, ômega 3 (SONATI e AFFONSO, 2007).

2.3.4. Benefícios de Algumas Substâncias Bioativas Presentes em Alguns Alimentos

A Tabela 2 abaixo apresenta alguns dados de alimentos funcionais e seus benefícios à saúde.

Tabela 2. Substâncias bioativas presentes em alguns alimentos e seus benefícios

Alimento	Substância bioativa	Benefícios
Frutas e vegetais amarelos	Carotenóides	Neutraliza radicais livres
Vegetais verdes	Luteína	Manutenção de visão saudável
Tomate e produtos de tomate, melancia, goiaba	Licopeno	Pode reduzir o risco de câncer de próstata
Farelos, cereais, cascas	Fibra insolúvel	Pode reduzir o risco de câncer
Aveia, leguminosas	β -glucana (fibra solúvel)	Pode reduzir o risco de Doenças Cardiovasculares (DCV)
Atum, truta, sardinha, bacalhau, peixes de água fria	Ácidos-graxos, Ômega 3	Pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares (DCV) e melhorar funções mentais e visuais
Frutas e vegetais, chás	Flavonóides	Neutralizam radicais livres e podem reduzir o risco de câncer
Vegetais crucíferos	Indóis	Neutralizam radicais livres e podem reduzir o risco de câncer
Alcachofra, chicoria, cebola, alho, banana, centeio, aveia	Prebióticos (oligossacarídeos)	Protegem a saúde gastrointestinal
iogurte e leites fermentados	Probióticos	Protegem a saúde gastrointestinal
Soja e Derivados	Isoflavonas	Podem reduzir os sintomas da menopausa

FONTE: (SONATI e AFFONSO, 2007).

3.3.5. Cereais

Os cereais constituem 60% da produção mundial dos alimentos em países mais industrializados, mas desta produção 70% é destinado à alimentação animal, ao contrário do que acontece nos países desenvolvidos que pelo menos 68 a 98% são destinados ao consumo humano. A qualidade destes cereais pode ser melhorada através da fermentação (CLAVAN e KADAN, 1989). A fermentação é uma das formas mais antigas e econômicas de produzir e preservar alimentos.

(WAINWRIGHT, 1992). Os cereais possuem composição completa de nutrientes necessários a nutrição humana, pois são constituídos de carboidratos (55-75%), proteínas (7-15%), lipídeos (0,50-7%), sais minerais (1-4%) e por oligoelementos. Os cereais mais comuns são: arroz, centeio, trigo, cevada, aveia, milho e milho miúdo (RAGOT, 1985; KENT, 1975); estes cereais são ricos em nutrientes, mas pode variar com clima, variedade, maneira do cultivo e conservação. Esses fertilizantes azotados diminuem o teor de vitamina A e C no cereal. Além disso, os adubos potássicos diminuem o teor de magnésio, que apresentam papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, depressão nervosa e fadiga, enquanto os pesticidas podem prejudicar a saúde (RAGOT, 1985).

Os cereais apresentam diversos benefícios ao organismo. Dentre as suas funções estão: função nutritiva, energética e remineralizantes desde que sejam consumidos na forma integral. O trigo e o arroz são os cereais mais equilibrados. O arroz convém mais para pessoas hipertensas e o trigo para as pessoas que sofrem de problemas intestinais. A cevada fortifica as células nervosas e favorece a calcificação do esqueleto. Já o centeio torna o sangue fluído e as artérias flexíveis. O milho é moderador do funcionamento da tireoide e o consumo da aveia é recomendada para hipotireoidianos, aos linfáticos, aos e aos que sofrem com elevado colesterol (RAGOT, 1985).

A Tabela 3 apresenta os principais componentes dos cereais trigo, cevada, milho, aveia e arroz.

Tabela 3. Principais componentes dos cereais

Composição química					
Constituintes	Trigo	Cevada	Milho	Aveia	Arroz
Água	13,2	11,7	12,5	13,0	13,1
Proteína	11,7	10,6	9,2	12,6	7,4
Lipídeos	2,2	2,1	3,8	5,7	2,4
Amido	59,2	52,2	62,6	40,1	70,4
Outros carboidratos	10,1	19,6	8,4	22,8	5,0
Fibra	2,0	1,55	2,15	1,56	0,67
Minerais	1,3	2,25	1,3	2,85	1,2

2.4. Produtos Obtidos por Fermentação

2.4.1. Fermentação no Estado Sólido (FES)

As fermentações já eram utilizadas nos tempos antigos, evidenciados pela produção de bebidas fermentadas tais como a cerveja e o vinho. No Egito e México, embora as técnicas de fermentação tenham sido aprimoradas, os processos fermentativos ocorrem no substrato natural de uvas e grãos, sendo que alguns são adicionados de água e ou são submetidos a algum pré-tratamento. A fermentação também foi e ainda é conhecida e considerada método para conservar alimentos. A fermentação com fungos *Rhizopus* já é conhecida há mais de 3000 anos na produção de molho de soja (soja, trigo, água e sal) (GROS, 2008).

A FES é definida como o processo no qual os microrganismos crescem em substratos sólidos na ausência de água livre (PANDEY *et al*, 2000;2008). A matriz sólida deve apresentar alguns nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação. Os substratos sólidos são comumente encontrados na natureza, que é considerado como processo de fermentação para o crescimento de microrganismos, devido ao crescimento destes no meio natural (RODRÍGUEZ-LEÓN *et al*, 2008).

A FES apresenta sua importância na biotecnologia, pode ser aplicada desde a escala laboratorial até a escala industrial. É um processo muito aplicado para a produção de biomoléculas por fungos e também visando o aumento da produtividade de fermentação, aumento na concentração do produto. (HOLKER *et al*, 1994).

As fermentações conduzidas com soja e farelo de arroz podem aumentar o nível de substâncias com atividade antioxidantes que trazem efeitos benéficos a saúde humana tais como a vitamina E (tocoferol, tocotrienol), vitamina C, antocianina, isoflavonas, β -caroteno, polifenol e orizanol. Várias proteínas são hidrolisadas liberando aminoácidos tais como tirosina, metionina, histidina, triptofano e prolina (SAIGA *et al*, 2003).

2.4.2. Fermentação Submersa (FSm)

No século passado já se utilizavam a fermentação para preservar alimentos e já produziam bebidas alcoólicas para seu consumo; os Babilônios produziam vinho de cevada, os Europeus já faziam pão, e no oriente já produziam misso, molho de soja, e os Romanos processavam peixes (BORZANI, *et al.*, 2001).

O método da fermentação para produção de alguns produtos é feito pela fermentação submersa (FSm), pois esta técnica é menos problemática, na transferência de calor e homogeneização; em algumas lugares utilizam a FSm para a produção de algumas enzimas. Na FSm o meio líquido fica em contato com o microrganismo, e na fermentação aeróbica o oxigênio é essencial (PANDEY *et al.*, 2000), sendo feito por injeção de ar, apresenta fácil controle de temperatura, mas corre risco de contaminação por outros microrganismos (RAIMBAULT, 1998).

Na fermentação em batelada os microrganismos são inoculados em volume fixo do meio, sob as condições ótimas de fermentação e somente é acrescentado de oxigênio quando necessário., ainda existe a fermentação em batelada alimentada que no início é acrescentado o inóculo, depois são acrescentados os nutrientes gradualmente ao meio. Já a batelada em perfusão a cultura e células vivas são adicionadas ao processo. E a fermentação contínua o meio novo é colocado durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo (BORZANI *et al.*, 2001; PANDEY *et al.*, 2000).

A FSm é economicamente atrativa, quando utilizados como meios de cultivo resíduos industriais líquidos, que eram despejados no ambiente em lavouras ou acrescentados à ração animal, para atuar como substrato para o crescimento de microrganismos (BLAKEBROUGH, 1987).

Geralmente o microrganismo na FSm requerem boa aeração, que é obtida por meio de agitação do meio de cultivo. Para os microrganismos que crescem na forma de aglomerados, na forma micelial como os fungos, a concentração de oxigênio no meio do cultivo deverá ser suprida a partir de agitação, impelidores ou difusores de ar instalados internamente nos biorreatores. Sempre é importante no processo fermentativo verificar o modo mais adequado, assim como para a recuperação dos metabolitos (BORZANI *et al.*, 2001).

2.4.3. Produtos Fermentados e Derivados à Base de Soja

Os produtos fermentados de soja são produtos originalmente produzidos e consumidos em maior escala na Ásia e Oriente Médio. Grande parte destes produtos são produzidos por descascamento e cozimento dos grãos de soja, e fermentação por meio do uso de diversas linhagens do fungo *Rhizopus* (no caso dos produtos fermentados tais como o *tempeh*) originalmente da Indonésia. (TAVARES e KIYAN, 2002).

A soja tem um importante papel na nutrição como fonte de proteína de alta qualidade. Segundo MORAIS (1996) os americanos comercializam produtos fermentados e não fermentados à base de produtos orientais fermentados e derivados tais como: “*tofu hot dog*”, “*tofu ice cream*”, “*veggie Burger*”, “*tempeh Burger*”, “*soymilk yogurt*”, “*soymilk cheese*”, ou “*soy flour pancake*”. Além das proteínas, carboidratos e ácidos graxos estão compostos por vitaminas e alguns minerais (WOLF e COWAN, 1971).

A partir da soja ainda existem os produtos não fermentados como o *tofu* (queijo de soja), *nimame* (soja integral cozido), *edaname* (soja verde), *abura age* (tofu frito), e fermentados como *sufu* (tofu fermentado), *shoyu* (molho de soja fermentado), *miso* (fermentado de soja), *natto* (fermentado de soja por *Bacillus natto*), *tempeh* (fermentado de soja por *Rhizopus oligosporus*) (FUKUSHIMA e HASHIMOTO, 1980).

Os fungos são geralmente cultivados sobre um substrato ou matriz sólida, sendo o processo denominado de FES (fermentação no estado sólido) (WARD, 1989). Os fungos requerem substratos que contêm nutrientes, geralmente com fontes de carbono e fonte de nitrogênio, além de macro e micronutrientes (como sais minerais e algumas vitaminas), e necessitam da aeração. O fermentado de soja pode ser preparado utilizando uma variedade de microrganismos (SWAN, 1979; NOUT, 2005) que inclui fungos, leveduras, bactérias lácticas e algumas bactérias gram-negativas (STEINKRAUS, 1983). Os fungos comumente relatados na fermentação de soja são *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *Mucor indicus*, *Trichosporon heigeltii*, *Clavispora (Candida) lusitaniae*, e leveduras *Candida maltosa* e *Candida intermedia* (SAMSON, 1987).

Durante o processo fermentativo o fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* é inoculado em maior quantidade (SHARMA, 1984) e *R. oryzae* e *Mucor spp.* podem ser adicionados para aprimorar o sabor, valor nutritivo e a textura do fermentado de soja (WIESEL, 1997). Uma mistura pura de inóculos de *Rhizopus oligosporus* e *Klebsiella pneumoniae* já foi relatada para a produção de vitamina B12 (SUPARMO, 1988).

Na Indonésia, *R. oligosporus* é a principal espécie utilizada na fermentação da soja e segundo HESSELTINE (1963) uma cepa identificada como *R. oligosporus* Saito NRRL 2710 é uma das melhores produtoras já encontradas.

Os principais carboidratos da soja (estaquiase, rafinose e sacarose) não são as únicas fontes de carbono consumidas pelo *Rhizopus spp.* Análises com microscópico eletrônico de varredura indicam que enzimas são secretadas pelo fungo para facilitar a degradação química dos compostos do substrato (SUDARMADJI, 1977). O crescimento microbiano pode ser acompanhado pelo consumo dos açúcares simples como glicose, frutose, maltose e xilose (SORENSEN e HESSELTINE, 1966).

O fungo *Rhizopus oligosporus* possui alta atividade proteolítica, importante para seu crescimento em substrato protéico, mas baixa atividade de enzimas amilase e pectinase (WAGENKNECHT, 1961; WANG e HESSELTINE, 1965). Os sistemas enzimáticos proteolíticos possuem atividade máxima entre 50 e 55°C e apresentam-se estáveis entre pH 3 e 6, sofrem desnaturação em pH abaixo de 2,0 e acima de 7,0 (WANG e HESSELTINE, 1965).

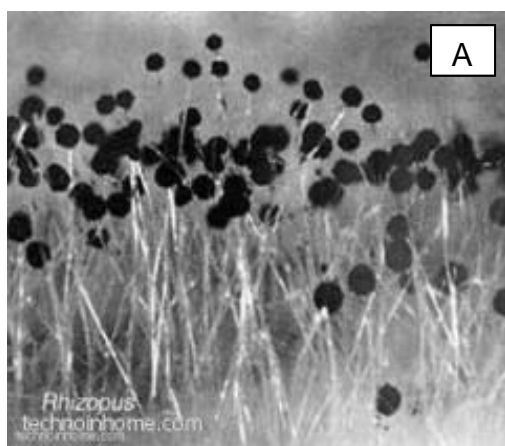
O processo fermentativo da soja pode influenciar no teor de compostos tais como ácidos graxos, vitaminas e proteínas (BAUMANN *et al.*, 1990; HERING *et al.*, 1991). Relatos do aumento relativo de vitaminas do grupo B como riboflavina, vitamina B6 e B12 devido à ação do metabolismo dos microrganismos estimulam novas pesquisas sobre os produtos fermentados de soja (BISPING *et al.*, 1993; KEUTH e BISPING, 1993).

A ação hidrolítica das enzimas produzidas pelos microrganismos permite a formação de peptídeos (HESSELTINE, 1983) com características melhores do que aqueles presentes na soja não fermentada (OKAMOTO *et al.*, 1995). Uma função importante do fungo na fermentação da soja é a síntese de enzimas que hidrolisam componentes da soja e promovem o desenvolvimento de textura e aroma desejável

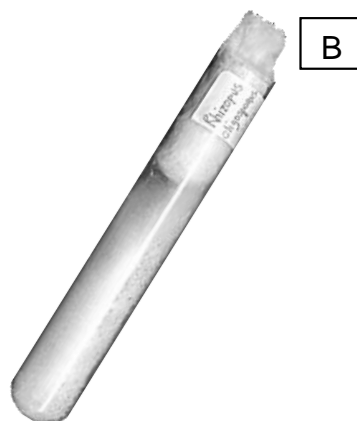
do produto (HACHMEISTER e FUNG, 1993). Segundo ANON (1969), *R. oligosporus* produz de 4 a 5 bactericidas durante o processo fermentativo, esse fungo também é capaz de limitar o crescimento e o acúmulo de aflatoxina B1 dos microrganismos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (NOUT, 1989).

A figura 2, apresenta a imagem do fungo *Rhizopus* sp: A) com seu corpo de frutificação com seu esporangiósporo e na B) tubo de ensaio com meio de cultivo com o crescimento de *Rhizopus* sp.

Figura 2. Imagem do fungo *Rhizopus* sp. A) Imagem microscópica do micélio e da formação do corpo de reprodução com os esporangiósporos; B) Linhagem mantida em tubo de ensaio inclinado contendo meio de cultivo.



FONTE: Techno in home (2009)



FONTE: Dominic Anfiteatro (2006)

3.4.4. Tempeh, produto fermentado de soja por *Rhizopus oligosporus*

O *tempeh* é um produto tradicional à base de soja fermentado por *Rhizopus oligosporus*. Originou-se na Indonésia e até os dias atuais é muito consumido na Indonésia e outros países orientais e asiáticos. O fungo é inoculado em grãos de soja previamente cozidos e descascados, e a fermentação degrada os carboidratos complexos e outros compostos orgânicos presentes na soja que possam causar problemas digestivos e flatulência (GHORAI *et al.*, 2009). O *tempeh* é normalmente consumido cozido, frito, assado ou grelhado. O processo de fermentação da soja para a obtenção do *tempeh* promove o aumento do valor nutritivo, com o aumento no teor de vitaminas, fitoquímicos e antioxidantes (ASTUTI e DALAIS, 2000).

Tempeh apresenta concentração de fitoestrógeno (as isoflavonas apresentam estrutura química semelhante aos estrógenos humanos, tal como o 17 β -estradiol, e por apresentar atividade estrogênica, essas substâncias são comumente referenciadas como fitoestrógenos) de aproximadamente 0,3 mg/g de proteína de soja (BHATHENA e VELASQUEZ, 2002). Os níveis de isoflavonas no *tempeh* é relativamente maior comparada aos outros produtos de soja tais como o tofu e bebidas à base de soja (HUTABARAT *et al.*, 2011). Na Malásia, o *tempeh* é rico em cálcio, assim como do leite e produtos lácteos. HARON *et al.* (2009) relataram que o conteúdo de isoflavonas em 100 g of *tempeh* cru representa (205 \pm 56 mg), sendo o maior conteúdo de isoflavona quando comparado aos demais produtos de soja e fermentados de soja, porém foi significativamente reduzido para 113 \pm 41mg em 100g de *tempeh* após a fritura do produto cru para consumo.

Além disso, o *tempeh* é uma excelente fonte de proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais. A qualidade proteica do *tempeh* é comparável com a qualidade proteica de carne bovina e suína. Além disso, o *tempeh* é uma excelente fonte de cálcio e baixo teor de gordura saturada. Apresenta elevadas concentrações de ácidos graxos essenciais e vitaminas do complexo B. É livre de colesterol por ser produzido a partir da soja (fonte vegetal) e apresenta elevado teor de fibras dietéticas. A fermentação do *tempeh* reduz fatores antinutricionais tais como o ácido fítico presente naturalmente nos grãos de soja; assim o consumo de *tempeh* não reduz os níveis de absorção de minerais pelo organismo. O produto torna-se mais facilmente digerível porque o processo de fermentação transforma as proteínas complexas presentes nos grãos de soja, quando comparados aos produtos derivados de soja não fermentados ou mesmo grãos de soja inteiros. Apresenta elevados níveis de isoflavonas e boa fonte de ácido fólico. Além disso, o *tempeh* apresenta baixo teor de sódio (BABU *et al.*, 2009).

Inúmeros benefícios da soja e produtos fermentados de soja (tais como o *tempeh*) para a saúde são citados na literatura. Dentre alguns benefícios estão a diminuição de riscos de doenças cardíacas e acidentes vascular cerebral, prevenção de osteoporose, câncer e distúrbios digestivos, além de aliviar sintomas de menopausa (BABU *et al.*, 2009).

3.5. Compostos Bioativos

3.5.1. Substâncias Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias naturais ou sintéticas que agem prevenindo ou retardando a deterioração causada pela exposição ao oxigênio, evitando a propagação das reações de oxidação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC e JAVANIVIC, 1994). Existem possibilidades de algumas doenças serem causadas pelos processos oxidativos celulares e espécies reativas de oxigênio tais como câncer, arteriosclerose, artrite, diabetes, doenças cardiovasculares e processos de envelhecimento (BRENA e PAGRIARINI, 2001).

Pesquisas que vêm sendo desenvolvidas relatam que a oxidação do LDL é decisiva na patogênese da arteriosclerose. A utilização dos antioxidantes atua na prevenção ou redução do desenvolvimento destas doenças. Os antioxidantes mais pesquisados são os flavonóides, vitaminas C, E e carotenóides. Os flavonóides são antioxidantes polifenólicos encontrados em verduras, frutas, grãos, sementes e ervas. Os flavonóides mais importantes são: quercetina, campferol, miricetina e crisina. A vitamina E (alfa-tocoferol) é encontrada em óleos de sementes, vegetais verdes e grãos de soja, e vitamina C em frutas cítricas, vegetais e carotenóides em frutas e legumes (COSTA *et al.*, 2000).

As doenças degenerativas como as cardiovasculares e neurológicas podem ser causadas pelo excesso dos radicais livres (PRIOR *et al.*, 1998) que reagem com DNA, RNA e proteínas (MELO *et al.*, 2006), e por isso existe o interesse em buscar antioxidantes naturais encontrados em frutos ou outras fontes naturais para substituir os sintéticos que podem apresentar efeitos colaterais (ITO *et al.*, 1983).

Segundo WANG e LIN (2000), os antioxidantes presentes em plantas podem atuar como quelante de metais, inibidores de enzimas, agentes redutores e sequestradores de radicais livres. Tais substâncias naturais são capazes de agir como nutracêuticos e otimizar a qualidade e estabilidade dos alimentos proporcionando benefícios à saúde dos consumidores (ARUOMA, 1998; LAI *et al.*, 2001).

O excesso de radicais livres tem diversas origens, desde defeitos no metabolismo celular como a respiração mitocondrial até ação de fatores exógenos como hábito de fumar ou nutrição inadequada (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). As

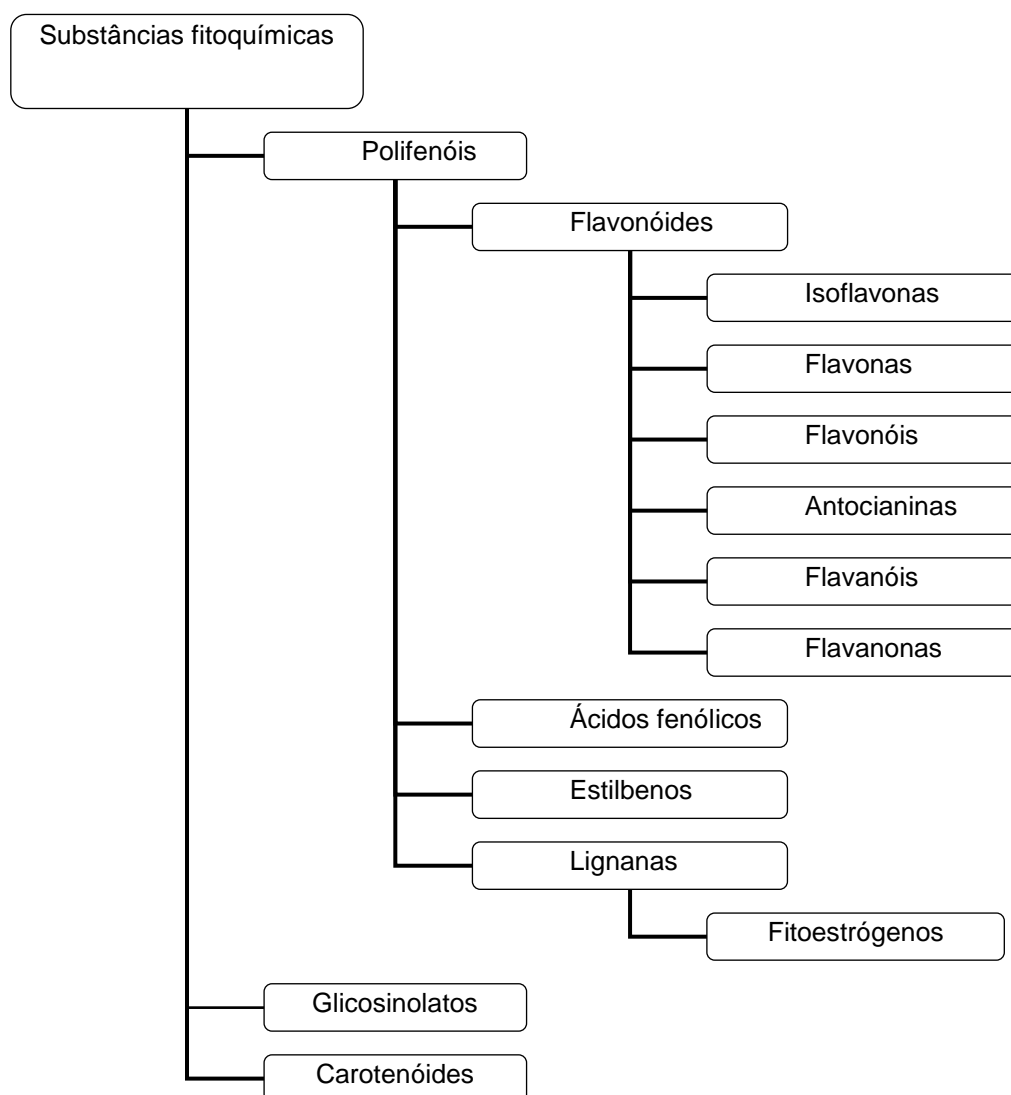
isoflavonas genisteína, daidzeína e glicitina são fitoestrógenos encontrados apenas na soja e são classificadas como antioxidantes naturais, pois são capazes de desativar os radicais livres do organismo e evitar a ação maléfica desses compostos (CAI e WEI, 1996).

Durante a última década, extratos de soja têm sido comercializados na indústria de alimentos devido à esse alto teor de compostos fenólicos, mas existe uma limitação de uso devido ao odor característico (MADSEN *et al*, 1997). Essa recusa não ocorre apenas na Indonésia, principalmente nas Filipinas e Malásia, onde o fermentado de soja é comumente consumido e devido às características nutricionais (ASTUTI *et al.*, 2000; NAKAJIMA *et al.*, 2005).

Segundo ANDREO e JORGE (2006), etanol e água são os principais solventes utilizados na extração de antioxidantes. Segundo LEAL, (2003), as substâncias bioativas podem ser extraídas tanto por água como também por tradicionais solventes orgânicos tais como o etanol, éter e metanol.

A Figura 3 apresenta um esquema com as diferentes categorias de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, com destaque para os flavonóides e fenólicos estudados no presente trabalho de pesquisa.

Figura 3. Esquema com as diferentes categorias de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, com destaque para os flavonóides e fenólicos estudados no presente trabalho de pesquisa.



FONTE: Baseado em BLASA *et al* (2010)

A Tabela 4 apresenta alguns compostos com atividade antioxidante biotransformados por fungos.

Tabela 4. Alguns compostos antioxidantes biotransformados durante a fermentação por fungos

Fungo	Antioxidante	Referência
<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina) reduzem e isoflavonas agliconas (genisteína e daidzeína) aumentam ao longo do tempo de fermentação. Quanto maior a concentração de isoflavonas agliconas maior é a taxa antioxidativa.	ESAKI <i>et al.</i> (1994) CHAIYAVAT <i>et al.</i> (2010)
<i>Taxomyces andreanae</i>	Diterpenóide taxol	STIERLE <i>et al.</i> (1993)
<i>Monascus ruber</i>	Monacolina K	CHANG <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus sartoi</i>	Ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, daidzeína, genisteína, ácido silingico, ácido vanílico, ácido p-hidroxidobenzóico e α -tocoferol	HIROTA <i>et al.</i> (2000)
<i>Cordyceps militaris</i>	Polifenol (ácido gálico) e flavonóide (rutina)	ZANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	Compostos fenólicos e flavonoides	KARIME <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Compostos fenólicos e flavonoides e p-hidroxibenzoato	ATUN <i>et al.</i> (2010)

3.5.2. Compostos Fenólicos

Os polifenóis ou compostos fenólicos são encontrado em grande parte em vegetais, ou como metabólitos secundário ou biossíntese, na sua forma normal ou em condições de estresse (NACZK e SHAHIDI, 2006).

Muitos compostos fenólicos de plantas são boas fontes de antioxidantes naturais, e interesses vem surgindo, devido os compostos fenólicos em alimentos que tem efeitos inibitórios sobre processos como a mutagênese e a carcinogênese.

O termo fenólico ou polifenol é definido quimicamente como substância que possui anel aromático tendo um ou mais substituintes hidroxil, são derivados ésteres, éteres metílicos, glicosídeos (ESKIN, 1990). A maioria destes compostos fenólicos

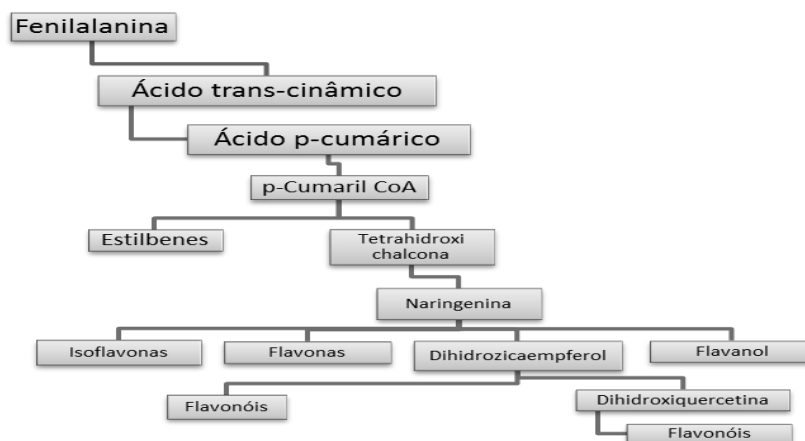
apresenta dois ou mais grupos hidroxilas. São substâncias bioativas que ocorrem em fontes vegetais utilizados para fins alimentícios (HO, 1992).

Os compostos fenólicos são classificados em: fenóis simples, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides, entre eles os mais importantes são os compostos fenólicos que são polifenóis. Dentre os flavonóides estão principalmente catequinas, proantocianinas e flavonas. As catequinas podem inibir o crescimento de tumores de câncer. Proantocianidinas ou taninos são encontrados em alimentos como: maçã, uva, sorgo, morango, ameixa e cevada. Segundo HO (1992) outros polifenóis, como ácido elágico e ácido clorogênico podem desempenhar um duplo papel protetor na carcinogênese por reduzir a biodisponibilidade dos carcinógenos, e por interferir com a sua biotransformação no fígado.

3.5.3. Biossíntese de Compostos com Ação Antioxidante (flavonóides e fenólicos)

A biossíntese de flavonóides inicia com uma série de reações. A primeira reação inicia com a desaminação de L-fenilalanina pela enzima fenilalanina-amônia-liase que forma o ácido cinâmico. O ácido cinâmico é hidroxilado por uma cinamato-4-hidroxilase que forma o ácido cumárico (VERPOORTE *et al.*, 2007). O grupo carboxil do ácido cumárico é então ativado com a coenzima A pela cumaril-CoA-ligase para formar 4-cumaril-CoA. O 4-cumaril-CoA participa das etapas de biossíntese dos compostos flavonóides (Figura 4) tais como as isoflavonas, flavanóis, flavonas e estilbenos. Na Figura 4 consta a rota metabólica da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor fenilalanina (aminoácido) necessário para ocorrer a biossíntese de ácido trans-cinâmico pelos organismos vivos e assim ocorrer a biossíntese dos demais compostos flavonoides (isoflavonas, flavonas, flavonóis e flavanonas) e alguns compostos fenólicos (estilbenos).

Figura 4. Esquema da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor fenilalanina (aminoácido) necessário para ocorrer a biossíntese de trans-cinâmico pelos vegetais.



FONTE: Baseado em VERPOORTE *et al.* (2007).

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) é a primeira enzima do metabolismo fenilpropanóide na maioria dos vegetais e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta às infecções (STRACK, 1997). É uma enzima largamente estudada por fisiologistas por causa de sua importância chave no metabolismo secundário das plantas (KUHN, 2007). Esta enzima tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos (ROSLER *et al.*, 1997) e bactérias (XIANG e MOOE, 2005). A invasão de patógenos pode desencadear a transcrição do RNA mensageiro que codifica esta enzima, aumentando a quantidade desta enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2006).

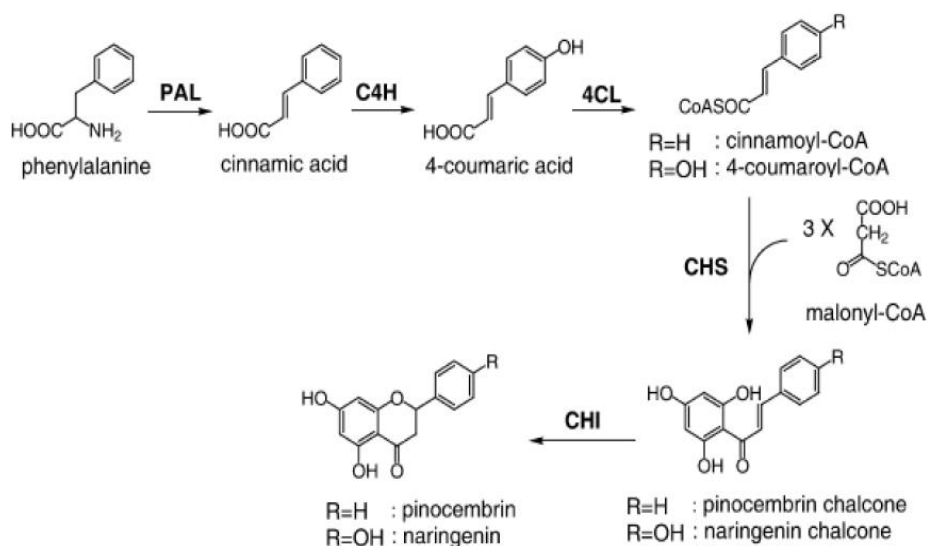
Os compostos fenólicos e flavonoides estão sendo muito empregados em pesquisas de medicamentos contra infecções, como exemplo a quercetina, rutina e morina que têm mostrado ação antiviral. Os compostos fenólicos (ácido ferulico e ácido transcinâmico) e os flavonóides (quercetina e kaempherol) são importantes, pois são medicamentos fitoterápicos utilizados no tratamento como antivirais, e que são compostos naturais que possam ter poucos efeitos colaterais (p/ que tratamento) (BRUM, 2006).

3.5.4. Metabolismo de produção de compostos flavonóides em vegetais

Em vegetais o aminoácido fenilalanina pode ser convertido pela enzima amônia liase em ácido trans-cinâmico, que é transformado em ácido cumárico e este por sua vez é convertido em ácido caféico (RECHNER *et al.*, 2001). Esses compostos são utilizados para a produção de flavonóides, com atividade antioxidante. A rota metabólica que permite a formação de favonols e fenilpropanols em plantas está relacionada ao ciclo pentose-fosfato (Calvin) e a quantidade sintetizada são características de cada organismo (DUVAL e SHETTY, 2001).

A Figura 5 apresenta um esquema das etapas de síntese de flavonoides em plantas. Nomes das enzimas estão abreviados da seguinte forma: PAL (fenilalanina ammonia liase), C4H (cinamato-4-hidroxilase), 4CL (4-cumaril-CoA-ligase), CHS (chalcone sintase), CHI (chalcone isomerase).

Figura 5. Esquema das etapas de síntese de flavonoides em plantas. Nomes das enzimas estão abreviados da seguinte forma: PAL (fenilalanina ammonia liase), C4H (cinamato-4-hidroxilase), 4CL (4-cumaril-CoA-ligase), CHS (chalcone sintase), CHI(chalcon)

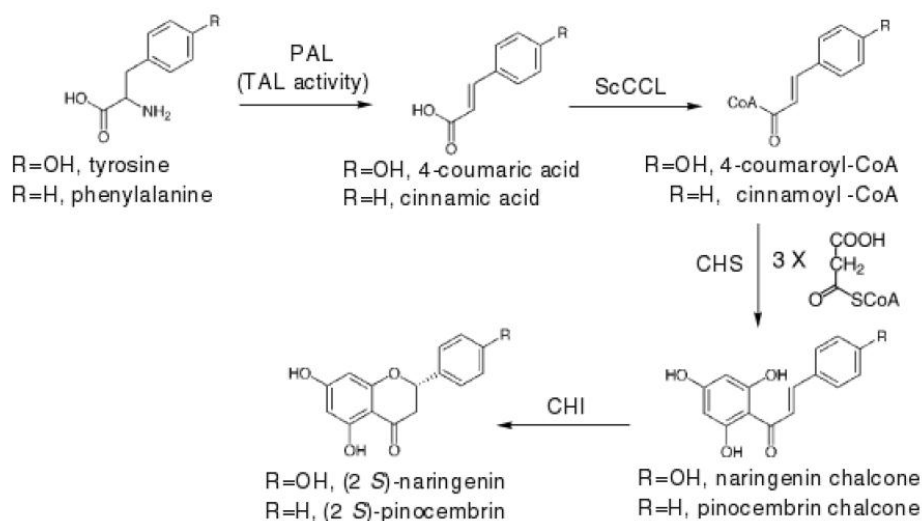


Fonte: DU *et al.* (2011).

3.5.5. Metabolismo de produção de compostos flavonóides por microrganismos

A Figura 6 abaixo apresenta a biossíntese heteróloga de flavonoides nos microrganismos. A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) também pode utilizar o aminoácido tirosina como substrato

Figura 6. Biossíntese heteróloga de flavonoides nos microrganismos. A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) também pode utilizar o aminoácido tirosina como substrato



Fonte: DU *et al.* (2011).

Embora o metabolismo para a formação dos compostos antioxidantes por muitos gêneros microbianos e sua importância ainda seja desconhecido, há um significativo aumento na quantidade de compostos fenólicos sintetizados pelas células pelo aumento da temperatura de cultivo de *Arthospira platensis* (cianobactéria), por exemplo. A produção desses compostos é alterada pela variação nas condições de cultivo, sugerindo que é possível aumentar o potencial antioxidante de *A. platensis* (COLLA *et al.*, 2007).

3.5.6. Isoflavonas

As isoflavonas genisteína e daidzeína obtidas da soja e seus produtos são formas biologicamente ativas dos fitoestrógenos, apresentando-se como compostos fenólicos heterocíclicos com potencial protetor no desenvolvimento de tumor mamário (MESSIMA, 1999). Além disso, as isoflavonas apresentam estrutura química similar ao principal hormônio feminino (estradiol) e essa característica incentiva pesquisas sobre os benefícios à saúde e a reposição hormonal. As isoflavonas e seu efeito antioxidante estão relacionados com o mecanismos de garantia de qualidade da semente, que se refere a capacidade desta em realizar funções vitais como germinação, vigor e longevidade (POPINIGIS, 1985). Uma hipótese é que a presença dessas substâncias evita a degradação da membrana celular, pois combatem os radicais livres que são responsáveis pela deterioração da semente (KRZYZANOWSKI *et al*, 2001). A dificuldade de incrementar a soja nos hábitos alimentares do povo ocidental faz com que o consumo de isoflavonas seja restrito ao uso de cápsulas contendo hipocótilo de soja (BROUNS, 2002).

As isoflavonas ocorrem naturalmente nos grãos de soja e na maioria dos produtos de soja, como β -glicosídeos conjugados (COWARD *et al.*, 1998). São compostos fenólicos responsáveis pela coloração de inúmeras verduras, frutas e flores. Eles têm atividade antioxidante, antifúngica, propriedades estrogênicas e atividades anticancerígenas (ESAKI, 1999; NAIM, 1974; MURPHY, 1982).

A soja é rica em isoflavonas como as daidzeínas, genisteínas e gliciteínas, presentes nos grãos de soja na forma de glicosilados (malonilglicosídeos e b-glicosídeos), quando manipulados (através da fermentação ou passar por um processo de tratamento, ou pela desesterificação) pode ocorrer na forma de agliconas e acetilglicosídeos. Alguns testes realizados com pessoas saudáveis demonstrou a redução do colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (GENOVESE e LAJOLO, 2001). Outro estudo demonstrou que as isoflavonas tiveram ação na prevenção e diminuição de certos tipos de câncer e no tratamento de osteoporose (SETCHELL e CASSIDY, 1999). As isoflavonas são fitoestrogênios isolados a partir da soja que, além de seu poder antioxidante, exercem efeitos hormonais e não hormonais pela capacidade de se ligar aos receptores de estrógeno (KURZER e XU, 1997).

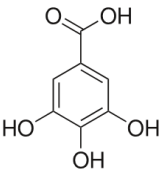
No tempeh, as isoflavonas estão na forma bioativa, por β - glicosidase que é reconhecida e absorvida pelo organismo. O teor de isoflavonas totais variam de 6,88 mg a 62,50mg/100g de soja tostada (USDA – IOWA STATE UNIVERSITY DATABASE ON THE ISOFLAVONE CONTENT OF FOOD, 1999).

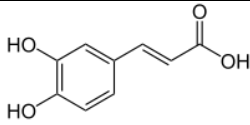
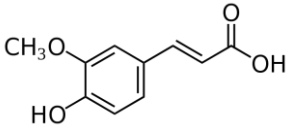
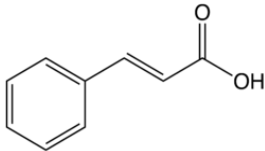
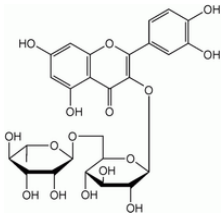
Nas últimas décadas, as evidências das pesquisas têm demonstrado que as isoflavonas trazem benefícios contra as doenças crônicas como câncer, diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares e podem prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose. Em humanos, dados mostram as incidências de câncer de mama, próstata e cólon e doenças cardiovasculares pela falta de hábito no consumo de isoflavonas de soja na alimentação. O resultado desta proteção tem demonstrado em experimentos em animais. Outros mecanismos hipotéticos podem produzir outras propriedades bioquímicas, como inibir atividade enzimática e apresentar efeito antioxidante (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

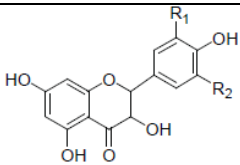
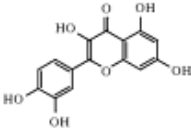
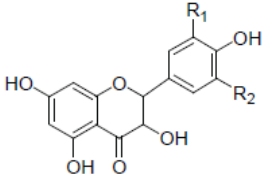
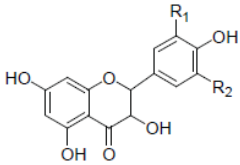
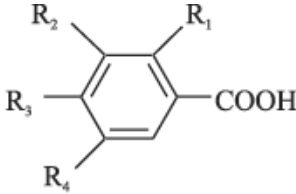
3.5.7. Compostos antioxidantes identificados da soja

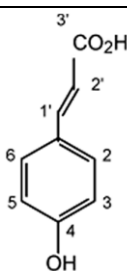
A Tabela 4 apresenta alguns compostos fenólicos reportados em grãos de cereais e produtos fermentados a base de cereais.

Tabela 5. Compostos antioxidantes identificados em soja e fermentados de soja e arroz integral

Composto fenólico	Características e funções	Referência
<p>Ácido gálico</p> 	- Classe dos ácidos benzóicos;	
	- Classificado no grupo dos taninos como tanino hidrolisável. Eficaz na proteção dos rins e apresenta poder antiviral contra (poliovírus, vírus herpes simples e vírus entéricos). Possui ação antimicrobiana e efeito parasitário.	POMPEU (2007); BAJAJ (1988); LU <i>et al</i> (2004); AKIYAMA <i>et al</i> (2001); KOLODZIEJ e KIDERLEN (2005)
Ácido caféico	- Classe dos ácidos cinâmicos, classificado como ácido hidroxicinâmico;	POMPEU (2007);
	- Intermediário na biossíntese de lignina; - Efeito antioxidante;	OLTHOF <i>et al</i> (2001).

Composto fenólico	Características e funções	Referência
	<ul style="list-style-type: none"> - Inibe a carcinogênese, embora outros experimentos mostrarem efeito carcinogênico; - Efeito imunomodulatório e atividade antiinflamatória. 	
<p>Ácido ferrúlico</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Classe dos ácidos cinâmicos; - A biossíntese do ácido ferrúlico se dá a partir da ação da enzima o-metil transferase sobre o ácido caféico; - Ácido ferúlico é um ácido hidroxicinâmico, um tipo de composto orgânico. É um fitoquímico fenólico abundante encontrado em componentes da parede celular de vegetais tais como arabinoxilanos como cadeias laterais covalentes. 	<p>POMPEU (2007); PACHECO-PALENCIA <i>et al</i> (2008)</p>
<p>Trans-cinâmico</p> 	<p>Sintetizado pelos organismos vivos a partir da fenilalanina.</p> <p>Pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferrúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres.</p>	<p>VERPOORTE <i>et al</i> (2007); CAVALCANTI <i>et al</i> (2005)</p>
<p>Rutina</p> 	<p>A rutina é um bioflavonóide solúvel em metanol, também conhecida como Vitamina P. Importante para a absorção e atividade da vitamina C.</p> <p>Sua ação é de antfragilidade capilar, fortalecendo os capilares reduz os sintomas de hemofilia e previne edemas nas pernas.</p>	<p>REVISTA ÉPOCA (1998)</p>
<p>Miricetina</p>	<p>Grupo dos flavonóis.</p> <p>Difere dos demais flavonóides pela presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C</p>	<p>MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006</p>

Composto fenólico	Características e funções	Referência
	 <p>Sendo: R1=OH e R2=OH</p>	
<p>Quercitina</p> 	<p>Grupo dos flavonóis;</p> <p>Difere dos demais flavonóides pela presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C</p>  <p>Sendo: R1=OH e R2=H</p>	<p>VERPOORTE <i>et al</i> (2007)</p> <p>MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006</p>
Caempferol	<p>Grupo dos flavonóis;</p> <p>Difere dos demais flavonóides pela presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C</p>  <p>Sendo: R1=H e R2=H</p>	<p>MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006</p>
Ácido siríngico	<p>Ácido fenólico, classificado no grupo dos ácidos benzoicos (conhecido como substância conservante e antimicrobiano).</p>  <p>R1=H; R2=R4=OCH₃; R3=OH</p>	<p>RAMALHO e JORGE (2006)</p>
Ácido p-cumárico	<p>Ácido fenólico presente em grãos de soja.</p>	<p>SOUZA FILHO, <i>et al</i> (2005); PRATT e BIRAC (1979)</p>

Composto fenólico	Características e funções	Referência
		

Ainda são encontradas algumas enzimas como as fitase e proteases. A fitase (mio-inositol-hexaquiifosfato fosfohidrolase) é uma enzima que catalisa a liberação do fosfato de fitato (mio-inositol hexaquiifosfato), o qual é a principal forma de fósforo predominantemente ocorrendo em grãos de cereais, legumes e oleaginosas (PANDEY A., 2001). As fitases tem um grande valor no melhoramento e qualidade nutricional de ração para animais, aumentando a quantidade de fosfato disponível (PANDEY, 2001). De acordo com LIU *et al.* (1998), a fitase é naturalmente encontrada em cereais como arroz, trigo, milho, soja, feijão e outras leguminosas ou sementes oleaginosas. Ácido fítico é um componente encontrado nas plantas, sementes e cereais que possui de 60-90% de fósforo total armazenado (ZUO *et al.*, 2010).

As proteases são uma das enzimas mais importantes, ev utilizados em diferentes indústrias, como de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes (NEGI, *et al*,2006) Os fungos são bastante utilizados para a produção desta enzima. As proteases são enzimas extracelulares que podem ser produzido por fermentação submersa e tanto fermentação em estado sólido utilizando os fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* e fermentação submersa com o *Bacillus sp.* (OGAWA, *et al.*, 1995).

3.5.8. Patentes encontradas em pesquisa

A Tabela 6 apresenta algumas patentes protegidas relacionadas ao presente trabalho de pesquisa.

Tabela 6. Patentes protegidas relacionadas ao presente trabalho de pesquisa

Título, autor	Geral	Microrganismo	Antioxidantes	Aplicação	Substrato
JOANNOU, 2006/ 7056952 (Isoflavone Metabolites)	Formulação de produtos com compostos bioativos	<i>Lactobacilli, Clostridium, Cândida e outras leveduras, Bifidobacterium, Streptococcus, Escherichia, Hafnia sp, Marganella sp, Pseudomonas sp, Bacillus sp, Corynebacterium sp, Pediococcus sp, Staphylococcus sp.</i>	Isoflavonas	Tratamentos hormonais e tratamento de cânceres	Não específica
NAIR, 2009/000 4334 (Dietary nutritional supplements for health care)	Formulação de suplementos á base de pó de soja, ervas e temperos Como natto, tempeh, misô e outros	<i>Stenotrophomonas, Xanthomonas, Flavobacterium, Capnocytophga, Altermonas, Cytoophage, Bacillus, Chryseobacterium, Empdobacter, Aurebacterium, Shinggobacterium, Staphylococcus, Azotobacter e Pseudomonas,</i>	Isoflavonas (genisteína, dadzeína e seus metabólitos), inibidores de protease, saponinas, fitoesteróis, ácido fítico e ácido graxo saturado MD-13	Potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças	Soja
KIERS <i>et al</i> , 2004/0166198 (Process for the manufacture of a fermented health-promoting product)	Formulação de um produto capaz de prevenir e tratar a diarreia sem provocar efeitos colaterais	<i>Rhizopus, Aspergillus, Mucor, Penicillium, Allomyces, Absidia e Syncephalastrum. A fermentação da soja é feita por Rhizopus microsporus.</i>	—	No tratamento da diarreia. (mas não são os antioxidantes os responsáveis pelo alívio dos sintomas)	origem vegetal (legumes, frutas, nozes, leguminosas, sementes, grãos, tubérculos)

Título, autor	Geral	Microrganismo	Antioxidantes	Aplicação	Substrato
ZILLIKEN, 1980/4232122 (antioxidants, compositions and methods of preparing and using same)	Produção de duas novas isoflavonas incluindo na composição o ergostadienriol e 6,7,4-trihidroxisoflavona com excepcional atividade antioxidante	<i>Rhizopus oligosporus</i> ATCC 22959 e <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9363	Ergostadienriol e 6,7,4-trihidroxisoflavona com atividade antioxidante	Estabilizadores para produtos alimentares, em gorduras e óleos. Para prevenção de tratamento de várias doenças	Soja
ARNAUD <i>et al</i> , 1975/391785 1 (fermented soya protein)	Tempeh na indústria, devido o poder antioxidante deste produto como o α -tocoferol e 6,7,4 trihidroxiflavonas	<i>Rhizopus oligosporus</i> e <i>R. oryzae</i>	α -tocoferol e 6,7,4 trihidroxiflavonas	tempeh utilizado como estabilizante, fonte de proteínas, agente flavorizante em alimentos	Soja e cereais como trigo e arroz
FRIEND <i>et al</i> , 1987/4642236 (Process for reducing the level of objectionable flavors in vegetable protein by microorganism contact	Redução do sabor desagradável	<i>Rhizopus oligosporus</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i>	-----	Redução do sabor desagradável das proteínas vegetais e o isolado de soja	Proteína isolada derivado de vegetais com fonte de sementes com óleo como a soja
BERG <i>et al</i> , 2006/7074441 (method for the production of fermented whole grain baley with	Alimentação humana com propriedade que beneficiam como valor nutricional	<i>Rhizopus spp</i>	minerais e vitaminas	Produto tipo tempeh, com bom crescimento microbiano, nutricional e qualidade	produto de grãos de cereais a cevada

Título, autor	Geral	Microrganismo	Antioxidantes	Aplicação	Substrato
<i>Rhizopus</i> , and products thereof)				sensorial	
ZILLIKEN, 1982/4264509 (Isoflavones and related compounds, methods of preparing and using and antioxidant compositions containing same)	Uso do antioxidante de tempeh para estabilizar óleos e gorduras	<i>Rhizopus oligosporus</i> ATCC 22959 e <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9363	antioxidante de tempeh, isoflavona	Antioxidante como as isoflavona do extrato de tempeh, para estabilizar gorduras e óleos (vegetais e animais)	Soja
ZILLIKEN, 1982/4366248 (fermentation method of preparing antioxidants)	uso do antioxidante de tempeh para estabilizar óleos e gorduras	<i>Rhizopus oligosporus</i> e <i>Rhizopus oryzae</i>	isoflavonas de tempeh de soja	Melhor estabilidade para substâncias sujeitas a deterioração oxidativa incluindo os alimentos comestíveis	Soja
HESSELTINE e SMITH, 1966/3243301 (Cereal-containing varieties of tempeh and process thereof)	produção de tempeh	<i>Rhizopus oligosporus</i> NRRL 2710, com Proposta para utilização de <i>Aspergillus</i> e outros <i>Rhizopus</i> .	Enzima proteolítica, lipolítica	Objetivo que o micélio se desenvolva em 25 horas	Soja, cereais como trigo, arroz, cevada, centeio e aveia
KIERS <i>et al</i> , 2004/0166198 (Process for the manufacture of a fermented	fermentação com fungos em substratos de vegetais	<i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Alomyces</i> , <i>Absidia</i> e <i>Syncephalastrum</i>	Produção de polipeptídeos	Tratamento e prevenção de diarreia	Legumes, frutas, castanha, feijão, sementes,

Título, autor	Geral	Microrganismo	Antioxidantes	Aplicação	Substrato
health-promoting product					grãos, tubérculos
GYORGY, 1972/3681085 (Food product containing tempeh)	produção de tempeh e peixe esterilizado sem gordura	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Produto rico em nutrientes, proteínas, carboidratos e vitaminas	_____	Soja e peixe
KATO <i>et al</i> , 2007/82088 (Fermented food)	fermentação com fungos	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Índices nutricionais e sabor agradável	Melhorar o sabor para alimentação	Soja e arroz germinado
MATAR e MARTIN 2007/0031517 (Antioxidant producing bacterium and uses thereof)	. Linhagens bacterianas foram isoladas da microflora da fruta blueberry, com efeito probiótico para adição/suplementação em ração animal; preparação de cosméticos e suplementação dietética	<i>Serratia, Hafnia, Novel, Ewingella, Yersinia sp</i>	Aumento da capacidade antioxidante	As linhagens são capazes de aumentar a capacidade antioxidante durante o crescimento em meio de cultivo	Extrato de frutas e/ou vegetais
MATAR e HADDAD, 2010/0092583 (Antioxidant producing bacterium and uses in the treatment and prevention of diabetes and obesity)	Fermentação com extratos de frutas enriquecido com antioxidantes com bactéria	Bactéria <i>Serratia vaccini</i>	Efeito terapêutico	tratamento e prevenção de diabetes e obesidade, diminuir o nível de glicose do plasma, aumento da circulação.	Extrato de frutas enriquecido com antioxidantes

Título, autor	Geral	Microrganismo	Antioxidantes	Aplicação	Substrato
PARK <i>et al</i> , 2003/39723 (Fermented drink with high level of natural antioxidants, octacosanol, beta-glucan)	_____	<i>Lactobacillum plantarum</i> e <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Antioxidante, octacosanol e B-glucana	Bebidas obtidas por fermentação com propriedades antioxidantes.	Extrato de malte, farelo de arroz e algas, glicose purificada e extrato de levedura
AOKI <i>et al</i> , 2003/161910 (fermented foods rich in gamma- aminated soybean foods rich in aminobutyric acid and free aminoacids produced by fermentation of soybean using Tempeh molds)	Os cereais utilizados para alimentos fermentados ricos em ácido aminobutírico	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Peptídeos, vitaminas, antioxidantes, minerais e isoflavonas	Fermentados para alimentação	Soja

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

As cepas de *Rhizopus* sp. utilizadas neste trabalho pertencem à micoteca dos Laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A conservação destas cepas foi realizada em tubos inclinados contendo ágar batata dextrose, conservados à 4°C, com repiques contínuos a cada três meses. São linhagens obtidas de coleções de cultura dos bancos de cepas NRRL (*Northern Regional Research Laboratory*), U.S. Department of Agriculture, Illinois - USA, e MUCL (*Mycothèque de Université Catholique de Louvain*), Bélgica. A relação das espécies utilizadas neste trabalho está listada abaixo.

Linhagens de *Rhizopus* spp. utilizadas neste estudo

Rhizopus LPB-R.01; ***Rhizopus*** LPB-R.02; ***Rhizopus*** LPB-R.03; ***Rhizopus*** LPB-R.04; ***Rhizopus*** LPB-R.05; ***Rhizopus*** LPB-R.06; ***Rhizopus*** LPB-R.07; ***Rhizopus*** LPB-R.08; ***Rhizopus*** LPB-R.09; ***Rhizopus*** LPB-R.10; ***Rhizopus*** LPB-R.11; ***Rhizopus*** LPB-R.12; ***Rhizopus*** LPB-R.13; ***Rhizopus*** LPB-R.14; ***Rhizopus*** LPB-R. 15; ***Rhizopus*** LPB-R.16; ***Rhizopus*** LPB-R.17

4.2. Substratos Utilizados para as Fermentações

Os seguintes substratos foram utilizados para teste do processo de fermentação no estado sólido.

Tabela 7. Substratos utilizados para fermentações

Substratos Puros	Substratos Combinados
Arroz integral	Arroz + Soja orgânica
Arroz Misto 7 grãos	Arroz Misto + Soja orgânica
Aveia	Aveia + Soja orgânica
Cevada	Cevada + Soja orgânica
Milho	Milho + Soja orgânica
Trigo	Trigo + Soja orgânica
Bagaço de cana	Bagaço de cana + Soja orgânica
Farinha de Mandioca	Farinha de Mandioca + Soja orgânica
Farelo de Soja	Farinha de Soja + Soja orgânica
Soja orgânica	

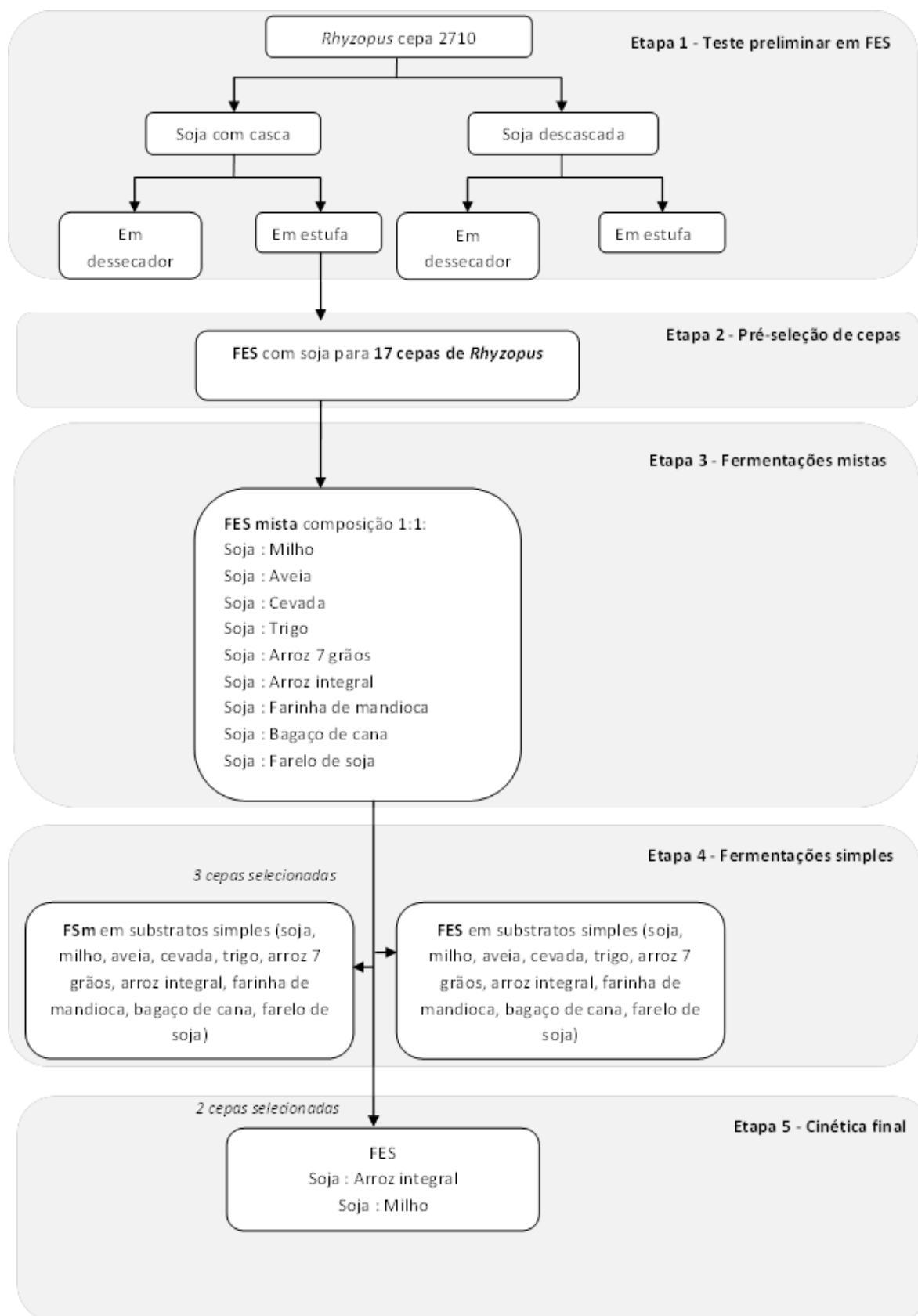
Os produtos arroz integral, arroz misto 7 grãos, aveia, trigo, cevada milho, soja orgânica e farinha de mandioca, foram adquiridos no comércio local da cidade de Curitiba, Paraná. O farelo de soja foi doado pela empresa INCOPA, bagaço de cana foi cedido por usinas sucroalcooleiras da região e soja orgânica, adquirida no mercado em grãos, provém da indústria Salet Ltda. Para os ensaios, os substratos puros descritos na Tabela 7 acima foram pesados (no total de 100 gramas), e quando misturados, foi utilizada a proporção 1:1. Após hidratação prévia (mantidos entre 12 e 16 horas em água acidificada), foram tratados termicamente em vapor fluente à 100°C por 15 minutos. Posteriormente foram resfriados e inoculados com taxa de inoculação de 10^7 esporos/g (esporos por grama de substrato seco) de suspensões de esporos previamente produzidas com as cepas *Rhizopus*; *Rhizopus* - LPB-R.14; *Rhizopus* - LPB-R.06; *Rhizopus* - LPB-R.04; *Rhizopus* - LPB-R.05; *Rhizopus* - LPB-R.09, as quais foram escolhidas baseados nos melhores resultados de 5 melhores cepas a partir do screening feito anteriormente, utilizando a soja como substrato para a determinação da atividade antioxidante(%). Os substratos inoculados foram homogeneizados, transferidos para bandejas perfuradas e incubados em estufa bacteriológica para as fermentações até 72 horas de fermentação a 30°C. Amostras foram retiradas a cada 12 h de fermentação, a fim de verificar a produção de antioxidante, bem como, avaliar o melhor tempo de fermentação com máxima produção de antioxidantes.

As fermentações foram realizadas com a soja + outros substratos (arroz integral, arroz misto 7 grãos, milho, trigo, cevada, aveia, bagaço de cana, farelo de mandioca e farelo soja), sendo que uma delas foi realizada apenas com soja como controle para comparação como controle; a fermentação foi realizada em 30°C na estufa bacteriológica da marca Fanem (modelo 502) e a fermentação teve duração de 48 horas.

4.3. Representação esquemática das etapas do trabalho

A figura 7 apresenta um esquema das principais etapas

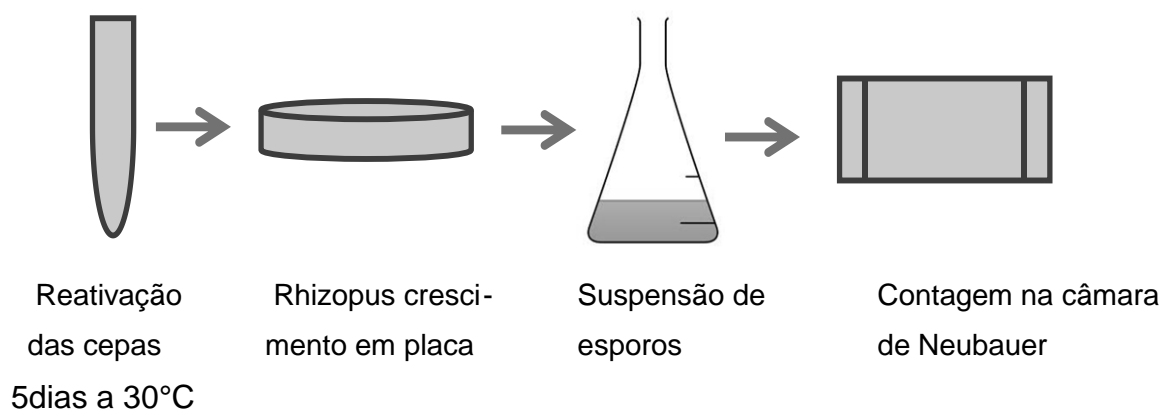
Figura 7. Esquema das principais etapas do processo de fermentação utilizando diferentes substratos e cepas de *Rhizopus*



4.4. Preparo do Inóculo

As cepas de *Rhizopus* sp. foram reativadas em tubos inclinados com ágar batata dextrose (PDA) por 5 dias a temperatura de 30°C. Depois foram transferidas para placas de Petri com o mesmo meio, e para que a superfície de produção de esporos fosse maior, já que objetivo era produzir uma grande quantidade de esporos. Após o crescimento do micélio e formação de esporos, a superfície de cada placa foi raspada com uma alça de platina e este micélio com esporos foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada esterilizada e tween 80 a 0,1% com pérolas de vidro. Desta suspensão de esporos foram realizadas contagens em câmara de Neubauer em microscópio óptico Marca Micronal, modelo (Figura 8). Para cada amostra foram inoculados 10^7 esporos por grama de substrato seco A Figura 7 apresenta um esquema das principais etapas do preparo do inóculo.

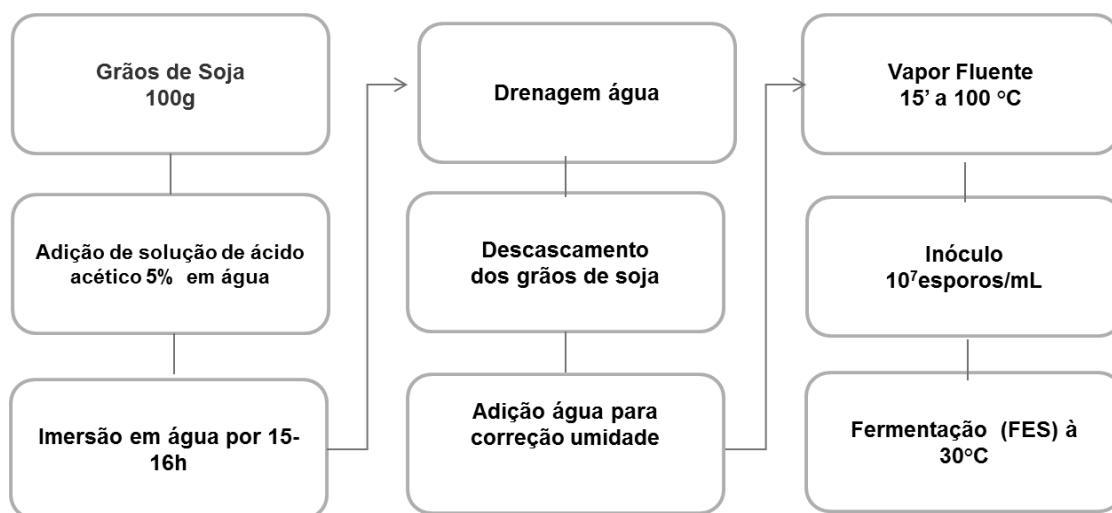
Figura 8. Etapas do preparo do inóculo e contagem



4.5. Preparo do Substrato/grãos de soja

A Figura 9 apresenta um fluxograma das etapas do preparo de substrato para fermentação da soja *Glycine max* orgânica. A metodologia apresentada seguiu o item descrito anteriormente, sendo adaptada conforme o esquema da figura abaixo.

Figura 9. Preparo do substrato com 100 g da amostra



Tanto as amostras de soja, quanto os substratos mistos foram deixados *uma noite* submersos em água acidificada com ácido acético a 5% em água potável. Após 15-16 h foi removida a água dos grãos com auxílio de uma peneira, nos primeiros experimentos a soja foi descascada. Todos estes substratos foram submetidos a um tratamento térmico para o cozimento dos grãos e para a redução da carga microbiana contaminante (vapor fluente à 100°C por 15 min), baseado em SHURTLEFF e AOYAGI (1950).

Três testes preliminares de fermentação foram realizados: Fermentação de grãos de soja descascados, fermentação de soja com cascas e fermentação com soja moída, para avaliar a produção de substâncias com atividade antioxidante.

4.6. Seleção de Linhagens de *Rhizopus* spp.

A partir das 17 cepas de fungos *Rhizopus* spp. foram realizadas as fermentações no estado sólido em bandejas, com duração total de 72 h e utilizando grãos de soja e outros substratos como: arroz integral, mistura de arroz (7 grãos),

aveia, cevada, bagaço de cana, farelo de soja, farinha de mandioca, milho e trigo. Foram escolhidos 5 cepas de *Rhizopus*: *Rhizopus* LPB-R. 05 *Rhizopus* LPB-R. 06, *Rhizopus* LPB-R. 09, *Rhizopus* LPB-R. 04, *Rhizopus* LPB-R. 14, que foram analisado atividade antioxidante pelo método de DPPH das amostras retiradas a cada 12 h, no total de 72 h de fermentação. As melhores cepas produtoras de antioxidante *Rhizopus* LPB-R. 05 e *Rhizopus* LPB-R. 06 foram selecionadas para os ensaios posteriores.

4.7. FES em Bandejas Tipo Peneira

A FES dos grãos de soja por *Rhizopus* LPB-R. 05 foi feita em bandejas perfuradas. A FES foi conduzida em biorreator do tipo bandeja dentro de um dessecador, para garantir a manutenção da umidade relativa do ar saturada no ambiente de fermentação, e reduzir os riscos de contaminação que ocorrem quando as bandejas são fermentadas diretamente dentro da estufa. O primeiro estudo foi realizado com a linhagem *Rhizopus* LPB-R. 05, variando-se o ambiente de fermentação, comparando-se a FES em bandejas diretamente dentro de estufa bacteriológica (marca FANEM 420) com a FES conduzida em bandejas dentro de um dessecador e este incubado dentro da estufa bacteriológica. Além disto, foram testadas diferentes formas do preparo da amostra de soja: amostras de soja com casca, soja sem casca e com soja moída para as fermentações, a 30°C em 24 h de fermentação.

As fermentações foram realizadas em bandejas perfuradas (tipo peneira) facilitando a aeração no fundo dos recipientes. As peneiras foram forradas na parte inferior e superior com papel alumínio perfurado previamente esterilizado a fim de assegurar a retenção da solução de esporos e a umidade de 60% requerida para o crescimento ótimo de fungos do gênero *Rhizopus* spp.

Os primeiros testes foram realizados em dessecador com tampa e um orifício de 2 cm de diâmetro foi vedado com tampão de algodão, permitindo assim a troca gasosa. Para garantir a atmosfera úmida saturada no fundo do dessecador foi colocado 500 mL de água deionizada adicionada de algumas gotas de hipoclorito de sódio a fim de evitar crescimento microbiano durante o período das fermentações fúngicas. A água no fundo do dessecador tinha a função de garantir a saturação do

ar com umidade, que permite a manutenção da umidade ao longo da fermentação com pouca variação no teor de umidade. Um experimento comparativo à fermentação em dessecador foi conduzido em estufa bacteriológica, mantendo as mesmas condições de umidade e aeração, à 30°C, e pH mantido entre 6,5±0,2. Amostras foram retiradas a cada 12 horas ao longo do tempo de fermentação.

4.8. Fermentação Submersa (FSm) ou Líquida

As amostras de soja, arroz integral, mistura de arroz (arroz 7 grãos), aveia, cevada, milho e trigo foram pesadas (10 gramas) de cada amostra, deixados de molho em água destilada de 12 a 16 horas, com exceção do bagaço de cana, farelo de soja e farinha de mandioca. Após a trituração das amostras em liquidificador com 100 mL de água, separado a parte líquida do sólido com auxílio de um filtro de com pano de TNT, o volume foi completado com água deionizada até 100 mL. Esses extratos foram autoclavados à 100°C por 15 minutos (vapor fluente).

Dez (10) gramas dos substratos bagaço de cana, farelo de soja e farinha de mandioca foram pesadas e a essas amostras foram adicionados 100 mL de água deionizada. A mistura foi, submetida ao tratamento térmico de 100°C (vapor fluente) por 15 min., e o sobrenadante foi separado da parte sólida por filtração e o volume completado para 100 mL com água deionizada e novamente autoclavado (100°C/15 min.), em erlemmeyer de 250 mL.

O inóculo consistiu em uma suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL e inoculados 10 mL em cada 100 mL de meio líquido (extratos aquosos dos substratos) previamente preparados na proporção de 10% p/v dos substratos em água.

Após o resfriamento, o extratos líquidos foram inoculados e incubados a 30°C em agitador orbital de bancada do tipo *shaker* (marca Tecnal, modelo T-420) a 120 rpm, por 96 h, da qual foram retirados 10 mL das amostras a cada 24 horas para análises de atividade antioxidante.

4.9. Determinação da Atividade Antioxidante

4.9.1. Extração dos produtos da fermentação

4.9.1.1. Influência da proporção de amostra fermentada e do tempo de extração na determinação da atividade antioxidante em FES

Um planejamento experimental 2^2 (2 fatores, 2 níveis) e 3 pontos centrais (Tabela 8) foi elaborado para estudar a influência da amostra sólida fermentada e do tempo de extração na atividade antioxidante presente no extrato bruto clarificado. Para a realização deste planejamento, amostras fermentadas por *Rhizopus* foram pesadas conforme experimentos apresentados na Tabela 8 (1, 2 e 3 g), diluídas em 25 mL de etanol P.A. à 70% v/v. A mistura foi submetida à agitação (extração sólido-líquido) em agitador do tipo *shaker* (marca Tecnal, modelo- TE 420) à 200 rpm à temperatura ambiente. Este estudo foi baseado na metodologia descrita por TYUG *et al.*, (2010).

Tabela 8. Delineamento experimental 2^2 (2 fatores, 2 níveis) e 3 pontos centrais apresentando as variáveis independentes amostra (g) e tempo de extração (h) na resposta %de atividade antioxidante. Os valores -1, 0, +1 representam os níveis das variáveis codificadas e entre parênteses os valores decodificados.

Experimento	Amostra (g)	Tempo de extração (h)
1	+1 (3,0)	+1 (2,0)
2	+1 (3,0)	-1 (1,0)
3	-1 (1,0)	+1 (2,0)
4	-1 (1,0)	-1 (1,0)
5 (C)	0 (2,0)	0 (1,5)
6 (C)	0 (2,0)	0 (1,5)
7 (C)	0 (2,0)	(1,5)

4.9.1.2. Etapas posteriores à FSm

Nas fermentações submersas (FSm), as amostras foram centrifugadas a 1609xg por 10 minutos para a remoção da biomassa e o sobrenadante armazenado em frascos de vidros tampados, e refrigerados para as análises descritas a seguir.

4.9.1.3. Extração sólido-líquido (FES)

Baseando-se na metodologia descrita por TYUG *et al.*, (2010), as amostras foram extraídas na proporção de (1:25 massa/volume), incubadas em agitador do tipo *shaker* e posteriormente filtradas. Para as amostras oriundas de fermentação no estado sólido (FES), foram feitas os extratos aquosos e alcóolicos conforme, descritas a seguir. As amostras foram pesadas (3,0 g da amostra fermentada) e adicionada em 25 mL de água ultra pura (extração aquosa) e outras 3,0 g de amostras em 25 mL de etanol 70% (extração alcoólica).. Antes das extrações das amostras foram macerados em gral com pistilo por aproximadamente 5 min. As amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 125 mL adicionando o volume adequado de solvente e submetidas à agitação de 120 rpm por 1 hora em agitador do tipo *shaker* (conforme os resultados estatísticos das melhores condições de extração demonstrados no item 5.2.1). Os extratos foram filtrados utilizando-se filtro (tecido TNT) e os filtrados recolhidos em tubos do tipo Falcon, os quais foram centrifugados a 1609xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em frascos de penicilina que foram tampados e armazenados à -18°C (freezer comercial) para posterior análise de atividade antioxidante.

4.9.2. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH

Os extratos alcóolicos e aquosos das amostras dos fermentados foram feitos conforme descrito no item 4.9.1.3

A atividade antioxidante foi determinada usando solução de DPPH com alto grau de pureza (1,1- difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), Sigma Aldrich) em solução

como radical livre. Foram dissolvidos 0,004 g de DPPH em 100 mL de metanol P.A. (Qeel e Alphatec), utilizado como reagente base para o preparo da curva padrão de BHA (butil hidroxianisol). O padrão BHA foi preparado a partir de uma solução estoque de concentração de 0,1 mg/mL e diluído nas concentrações de 0,02 a 1,00 mg de BHA/mL. 4 mL da solução de DPPH foram utilizados. A partir dos resultados da curva padrão foi possível obter o valor de IC₅₀ (índice que representa a concentração da substância antioxidante capaz de reduzir 50% dos radicais livres). O mesmo procedimento foi realizado com as amostras fermentadas. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 517 nm (marca Spectrum, modelo UV-VIS-spectrophotometer).

A atividade antiradical livre é definida como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH para 50% (IC₅₀—concentração inibitória), seguindo a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) com algumas modificações, como: o volume de análise de 1 mL de DPPH em 250 µL da amostra, analisadas em duplicata.

Para o controle (branco) foi considerada a solução sem amostra, apenas com 250 µL de etanol P.A. e as amostras foram analisadas nas diluições de 0,2 mL a 1,0 mL (50; 100; 150; 200; 250 µL). Para cada amostra foi adicionado 1,0 mL de DPPH. A reação foi mantida na ausência de luz por 30 min., em temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm (marca Spectrum (modelo UV-VIS-spectrofotometer).

Os cálculos de % de inibição foram calculados da seguinte forma:

$$inibição (\%) = \left[\frac{A^{controle} - A^{extrato}}{A^{controle}} \right] \times 100$$

Onde:

$A^{controle}$ = absorbância do padrão DPPH (diluindo com etanol ou água)

$A^{extrato}$ = absorbância do padrão DPPH com o extrato da amostra (etanol ou água) (BRAND-WILLIAMS *et al.*,1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*,1998).

E a partir dessas porcentagens (%) foi plotado um gráfico (ver ANEXOS) e gerada uma equação da reta para o cálculo de IC₅₀. A atividade anti-radical livre (expressa como IC₅₀) é definida como a quantidade de antioxidantes necessária para reduzir a concentração de DPPH inicial para 50%. Quanto maior o poder anti-radical livre, mais eficiente é o antioxidante (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

O índice IC₅₀ é calculado através da equação gerada pelo gráfico, plotada através das porcentagens encontradas das diluições, e lida no espectrofotômetro à 517nm.

4.9.3. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS

O extrato das amostras fermentadas foi obtido conforme descrito no item 4.9.1.3, e a atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método do ABTS (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzil-tiazolina-6-sulfônico) adaptado na metodologia descrita por RE *et al.* (1999). Foi utilizado reagente ABTS (Sigma). Uma solução estoque de ABTS em água destilada foi preparada na concentração de 7 mM. O reagente persulfato de potássio foi adicionado para uma concentração final de 2,45 mM. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente ao abrigo da luz, por mais de 16 h antes de ser utilizada nos ensaios. Este reagente foi armazenado à temperatura ambiente ao abrigo da luz, por no máximo 2 dias para uso em análise. Previamente ao uso, a solução estoque foi diluída com etanol absoluto até uma absorbância de 0,700, medida em um espectrofotômetro a 734 nm (marca Spectrum, modelo UV-VIS-espectrofotometer), em relação a um branco de água destilada.

Uma metodologia para leitura da absorbância em microplaca descrita por GRUPTA (2008) para amostras de 5 µL em 250 µL de ABTS foi adaptada para uso de 195 µL de solução de ABTS em microplaca de 96 poços. Para isso, as amostras foram diluídas nas proporções de 10 µL, 30 µL e 50 µL, para um volume final de 50 µL. A partir destas diluições, foram distribuídos 5 µL de cada amostra nos poços da microplaca, e em seguida adicionados 195 µL de solução de ABTS. Esta técnica permitiu realizar uma leitura mais rápida à temperatura de 37°C. Foram determinadas leituras de absorbância em 1 minuto e 30 segundos, 4 minutos e 30 segundos, e 6 minutos e 30 segundos, sob a comprimento de onda de 734 nm, em

relação a um branco de água destilada, em espectrofotômetro tipo leitor de ELISA (BioTek "Power Wave" XS), usando o programa KC Junior para a coleta dos dados.

A atividade antioxidante foi determinada como % de inibição do ABTS em função da concentração dos extratos usando como referência uma curva padrão, elaborada com diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 0,75 e 1,0 mM) de trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um antioxidante sintético, com marca registrada por Hoffman LaRoche) adquirido da Sigma.

A atividade antioxidante relativa foi obtida da seguinte forma: primeiramente, gráficos de % de inibição foram plotados em função da concentração dos extratos/padrões para cada tempo. Em seguida, a % de inibição o coeficiente angular (a derivada) destes gráficos por μL do antioxidante padrão foi plotado em função do tempo. A atividade antioxidante de cada extrato, relativa ao Trolox, foi calculada como a razão entre as áreas sob os gráficos (integrais): extrato/Trolox, para o intervalo de 30 segundos a 6 minutos e 30 segundos, esta razão é denominada TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox).

Para realização desta metodologia a solução de ABTS deveria ter absorvância de 0,700. Para isso a solução de ABTS foi diluída em etanol P.A concentrado até obter a leitura no valor de 0,700 instantaneamente. Para uma melhor sincronização das reações, foi utilizada uma micropipeta multicanal para a adição do reagente ABTS nas microplacas.

Os resultados foram estatisticamente comparados, aplicando-se ANOVA de uma via e pós-teste de Tuckey, para níveis de significância de 1% e 5% ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Esta análise foi realizada com o software Graphpad Prism 3.0.

4.9.4. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

Os extratos com as amostras foram obtidos conforme descrito no item 4.9.1.3

Curva de calibração de ácido gálico: Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, conforme a metodologia descrita por (MILIAUSKAS *et al.*, 2004). Uma solução-mãe de ácido gálico foi preparada com 50 mg em 100 mL de etanol P.A. A partir da solução-mãe

foram preparadas as diluições nas seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL, 0,5mL destas diluições foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) a 10% v/v mantido em repouso por 5 minutos, na ausência de luz à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de potássio a 4% p/v, agitado e mantido por 2 horas em repouso ao abrigo da luz. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrômetro a 740nm (marca Spectrum e modelo UV-VIS-espectrofotometer) (SINGLETON, 1965; KROYER e HEGEDUS, 2001; MINUSSI, 2003).

Os compostos fenólicos totais dos extratos, em solução etanólica a 70% v/v e em solução aquosa, foram submetidos à reação colorimétrica de determinação de compostos fenólicos descrita por SWAIN e HILLS (1959), onde os compostos fenólicos presentes nas amostras reduzem o reagente de Folin-Ciocalteu formando um complexo azul de coloração intensa.

As concentrações de compostos fenólicos em ácido gálico foram determinadas a partir de testes realizados com concentração inicial do extrato, respeitando o limite detectável da reação, estabelecido previamente pela curva de calibração do ácido gálico. As amostras foram diluídas em 1:2 e alíquotas de 0,5 mL do extrato foram adicionados de 2,5 mL de reagente aquoso de Folin-Ciocalteu a 10%, e 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 4%. Em seguida, foram mantidos em repouso por 2 horas e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 740 nm (marca Spectrum modelo UV-VIS-espectrofotometer), utilizando metanol P.A. como branco. Cada amostra foi analisada em triplicata. O teor de fenóis foi expresso como equivalente de ácido gálico (GAE) em mg de ácido gálico por g de extrato, obtido a partir da aplicação da equação:

$$\text{GAE} = C \times V / m$$

Onde GAE = equivalentes de ácido gálico em mg/g,

C = concentração de ácido gálico em mg;

V = volume de extrato usado no teste;

m = massa do extrato em g.

4.9.5. Determinação da Atividade de Fitase

Com o objetivo de se avaliar a redução do ácido fítico presente nos grãos de soja (ácido fítico), a atividade de fitase foi determinada durante a FES. O substrato fermentado por 72 h foi submetido ao processo de extração sólido-líquido para a recuperação da enzima fitase produzida conforme descrito abaixo: Pesou-se 5 g do fermentado utilizando água ultra pura com pH corrigido para 6,0 a 4°C, seguindo uma relação de extração de 1:10 (massa de meio fermentado (g) : volume de água ultra pura (mL)).

Os substratos fermentados adicionados de água foram macerados por 3 minutos em gral, posteriormente filtrados em tecido TNT. O líquido filtrado foi centrifugado a 4500 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado (denominado extrato bruto enzimático), o qual foi mantido sob refrigeração (4°C) .

A determinação da atividade da fitase foi medida pela liberação de fósforo inorgânico de acordo com a metodologia descrita por HEINONEN e LAHTI, (1981) com algumas modificações conforme SPIER *et al.* (2009), expressa em U/gbs (unidade de atividade enzimática por grama de amostra na base seca). 350 µL de substrato (fitato de sódio a 2,5 mM (Sigma) em 0,2 M de tampão acetato de sódio, pH 5.0) foram previamente incubados a 50°C por 5 minutos, e adicionada uma alíquota de 50 µL de enzima. A reação ocorreu em banho-maria à 50°C por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 1,5 mL de solução de AAM (10 mM de molibdato de amônio: 5N de H₂SO₄: acetona) na proporção 1:1:2, e por último 100 µL de ácido cítrico foi adicionado. Uma unidade de enzima (U) representa a liberação de 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a leitura realizada em espectrofotômetro à 355 nm (marca Spectrum e modelo UV-VIS-espectrofotometer).

4.9.6. Determinação da Atividade de Protease

4.9.6.1. Metodologia para extração da amostra

A extração das enzimas de proteases foi feita segundo IKASARI e MITCHELL (1996), com algumas modificações. Três soluções-tampão foram preparadas (tampão citrato 0,1M, pH 5,0; tampão fosfato 0,1M, pH 6,0; tampão glicina (NaOH) 0,1M, pH 4,0) e 1 solução de NaCl 2% pH 6,0

As amostras foram preparadas nas proporções de 1:10, 2:10 e 3:10 g/mL com cada solução descrita. As amostras foram preparadas em temperatura ambiente para evitar a degradação térmica durante o processo de extração.

As condições de extração foram previamente estudadas para a extração de proteases das amostras fermentadas sólidas. Desta forma, a solução de NaCl a 2% p/v ajustada para pH 6,0 foi utilizada nas análises de determinação da atividade protease.

As amostras foram pesadas, adicionadas as soluções preparadas nas proporções descritas e maceradas em um gral de porcelana com pistilo por 5 minutos, até que uma amostra de trituração homogênea fosse obtida, em seguida, as amostras foram filtradas em um filtro (tecido TNT), refrigeradas e então centrifugadas a 5589xg, por 5 minutos (marca Cientec, modelo CT-6000).

4.9.6.2. Determinação da Atividade Proteásica

A atividade de protease foi determinada segundo a metodologia de HAMES-KOCABA e UZEL (2007) modificada de TAKAMI *et al* (1989), onde 1 U de protease representa µg de tirosina liberada por minuto (dentro das condições padrão de teste).

Preparo das soluções para análise

O substrato recomendado para a reação da enzima é a caseína (Sigma), que foi preparada em solução contendo 1% p/v em solução de glicina (0,05M) e NaCl (0,05M), homogeneizado e ajustado o pH para 6,0, utilizando solução de NaOH (0,05M) sob agitação magnética até a completa homogeneização da solução. A solução de TCA (ácido tricloroacético) foi utilizada para interromper a reação

enzimática e preparada na concentração de 0,44 M. Uma solução de Folin Ciocalteu: fenol: 1:3 em água (preparada no momento do uso). E solução de NaCO_3 a 0,5M.

A análise foi realizada pela mistura de 0,5 mL de solução de extrato enzimático com 2,5 mL de solução de caseína, incubada por 20 minutos a 30°C em banho-maria. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de solução de TCA a 0,44 M, e permaneceu em repouso por 10 minutos para então ser centrifugada a 8048xg por 10 minutos. Alíquotas de 0,5 mL de sobrenadante foram misturadas com 2,5 mL de NaCO_3 e 0,5 mL de solução de Folin Ciocalteu de fenol. A mistura foi mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm (marca Spectrum e modelo UV-VIS-spectrofotometer). A atividade proteolítica ficou definida como U (1 unidade de atividade enzimática para cada 1 mg de tirosina liberada por minuto), foi determinada pela concentração de tirosina pela análise da curva padrão. O branco da enzima e substrato foi preparado contendo os mesmos volumes e reagentes, porém a enzima foi adicionada após a adição de TCA.

4.9.7. Determinação de Isoflavonas

A extração das isoflavonas foi realizada segundo a metodologia descrita por FUKUTAKE *et al* (1996), com algumas modificações. 1 g da amostra de soja fermentada foi pesada e triturada em gral e pistilo e desengordurada em 10 mL de n-hexano por 30 minutos a 25°C. A suspensão foi centrifugada e separada do sobrenadante, permanecendo a temperatura ambiente para secagem. A amostra foi então submetida à extração com 10 mL de solução de metanol P.A. a 80% v/v durante 2 horas a 25°C, em seguida centrifugada. O sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF com 0,22 μm de porosidade e 13 mm de diâmetro. Sendo então submetidas à análise em cromatografia líquida (CLAE-FR).

O extrato de soja com metanol foi analisado em cromatografia de alta eficiência em fase reversa como o descrito por ESAKI *et al* (1998). Foram injetados 20 μL do extrato em HPLC (marca Varian, modelo Pro star), em coluna C18, detector PDA (Photodiode Array (PDA) Detector - (detector de arranjo fotodiodo)), fluxo de 2mL / minuto, eluição com gradiente consistindo de aumento linear de 20 a

80% de metanol em água e ácido acético (99:1), e detectado em absorbância de 254nm. Foram utilizados como padrões genisteína e daidzeína, pelo tempo de retenção, utilizando como base a curva padrão construída com 5 pontos com ($R^2=0,9662$; $R^2=0,9712$ respectivamente).

4.9.8. Determinação Indireta de Biomassa pela Quantificação de Ergosterol

A biomassa foi determinada indiretamente pelo método de quantificação de ergosterol (componente da parede celular dos fungos) nas amostras fermentadas, e expresso em mg ergosterol por g de biomassa seca. Amostras fermentadas foram coletadas a cada 12 h até o tempo de fermentação de 72 horas. O método envolveu a extração de ergosterol com n-hexano e analisado em HPLC conforme SEITZ (1979) com algumas modificações.

Esta metodologia foi realizada com 1 g de fermentado, 4 mL de etanol e 2 mL de NaOH 2 M incubadas em banho-maria a 70 °C por 1 hora. Em seguida, 4 mL de HCl 1 M e 2 mL de 1 M KHCO_3 e 4 mL de n-hexano foram adicionados. A mistura foi então agitada vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 4500 g por 5 minutos e foram coletadas a fase superior (n-hexano). Após a adição de mais 4 mL de n-hexano, uma segunda centrifugação foi realizada a 4500 g por 3 minutos. Após, a adição de mais 2 mL de n-hexano, uma terceira centrifugação foi realizada em 4500 g por 2 minutos.

Todos os sobrenadantes (fase superior) foram armazenados em um recipiente ao abrigo da luz e aberto para a evaporação do solvente (n-hexano). Os extratos secos foram ressuspensos em 1000 μL de álcool etílico, filtrados em membrana de PVDF com 0,22 μm de porosidade e 13 mm de diâmetro, e analisados em um HPLC Varian modelo Pro Star utilizando uma coluna C18 e detector de arranjo de diodos ajustado para 282 nm. Injetou-se 10 μL de amostra com o auxílio de uma seringa. As fases móveis empregadas foram metanol (0-3 minutos), acetonitrila (3-10 minutos) e metanol (10-15 minutos) todos com alto grau de pureza com taxa de fluxo de 1 mL / minuto.

Como padrão, foi utilizada uma solução de ergosterol 95% (Fluka) com 1000 μg / mL, com diluições de 500, 250 e 125 μg / mL. Este ensaio foi realizado para

determinar a concentração de ergosterol por g de biomassa seca. A biomassa foi cultivada em um meio de crescimento, lavada com água ultra pura, seca em estufa (dentro de um frasco contendo sílica-gel) e o teor de ergosterol foi determinado. A taxa de recuperação de extração do ergosterol foi também considerada neste ensaio. A porcentagem (%) de recuperação de concentração conhecida de ergosterol em uma dada amostra (amostra dopada) também foi determinada. O desempenho dessa metodologia também foi avaliado por SPIER *et al* (2010).

4.9.9. Determinação de Açúcares

Preparo da amostra

O extrato foi preparado a partir de 3 gramas de amostra diluída em 25 mL de água ultra pura, macerado com auxílio de um gral e pistilo, mantido em agitação por 1 hora. Em seguida, o conteúdo foi filtrado e centrifugado durante 10 minutos a 1609xg. Os sobrenadantes foram então utilizados para a análise de açúcares totais e redutores.

4.9.9.1. Determinação de Açúcares Totais

Para a determinação de açúcares totais seguiu-se o método descrito por DUBOIS (1959). Em 0,5 mL do sobrenadante obtido na etapa anterior foi adicionado de 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico P.A. concentrado. Após o resfriamento da amostra, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 490 nm (marca Spectrum e modelo UV-VIS- espectrofotometer). A curva de calibração foi obtida a partir da solução padrão de glicose P.A. a 0,01 g diluída na proporção de 1:10, equivalente a 100 µg/mL de concentração final. Foram distribuídas alíquotas de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mL. Foram adicionados o fenol e ácido sulfúrico, homogeneizados e mantidos em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. E os resultados foram expressos em g/L.

4.9.9.2. Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada de acordo com o método descrito por MILLER (1959) utilizando-se o reativo DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico-da Vetec). Para o preparo do reativo DNS utilizou-se solução de NaOH a 2 N, 2,5 g de DNS e 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio.

A curva de calibração foi preparada utilizando-se solução de glicose P.A. a 10 mM. A partir desta solução foram preparadas 5 diluições em tubos de ensaio (de 0 a 10 mM). 1,0 mL da amostra foi adicionada a 1,0 mL de DNS e incubados em ebulição em banho-maria por 5 minutos. Posteriormente os tubos foram retirados e resfriados. Em cada tubo foi adicionado 5 mL de água deionizada e homogeneizado. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro à 540 nm.

As análises foram realizadas nas mesmas proporções para as amostras 0,5 mL do extrato líquido previamente diluído foi adicionado em tubo de ensaio e adicionado 0,5 mL de DNS. A mistura foi incubada por 5 min em ebulição. Depois os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionados 5 mL de água deionizada. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro à 540 nm. E os resultados foram expressos em g/L.

4.9.10. Identificação e Quantificação de Compostos Antioxidantes

4.9.10.1. Preparo das amostras

Amostras fermentadas (3 g) foram extraídas com 25 mL de etanol P.A. a 70% v/v em agitação por 1 hora. Após a extração, as amostras foram filtradas, centrifugadas e o sobrenadante filtrado em membranas de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA).

4.9.10.2. Identificação e quantificação por HPLC por arranjo de diodo

A análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para quantificar de compostos fenólicos específicos presentes nos extratos dos fermentados. O sistema HPLC (marca Dionex, modelo Ultimate 3000 HPLC, Idstein, Germany) foi utilizado, equipado com uma bomba Ultimate 3000, compartimento amostrador em coluna Ultimate 3000, e um detector por arranjo de diodo Ultimate 3000, e software Chromeleon para identificar e quantificar os compostos antioxidantes. A coluna de fase reversa Acclaim® 120, C18 5 μ m 120 A (4.6 mm x 250 mm) foi utilizada para separar os compostos. A coluna foi mantida à 40°C durante as análises, e a detecção foi realizada em 3 comprimentos de onda (280, 320, e 370 nm). O volume de injeção de amostra foi 10 μ L. A fase móvel (A) consistiu em água acidificada com 1% v/v de ácido fosfórico e a fase (B) com metanol. A eluição dos compostos foi realizada com um gradiente entre as fases móveis. O gradiente seguiu as seguintes proporções: 0-15 % B em 2 min, 15-25 % B em 5 min, 25-30 % B em 10 min, 30-35 % B em 15 min, 35-50 % B em 25 min, 50-60 % B em 30 min, 60-80 % B em 35 min, 80-100 % B em 45 min e 100-5 % B em 60 min. Um fluxo da fase móvel de 1.0 mL/min foi utilizado. Padrões de ácido gálico, catequina, ácido sirínico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, rutina, miricetina, ácido trans-cinâmico, quercetina e caempferol foram utilizados para obter a curva padrão dos compostos. Soluções estoque de todos os padrões foram preparadas em metanol e as curvas de calibração foram obtidas a partir das injeções em pelo menos 5 concentrações. Para as análises em HPLC, os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com os tempos dos padrões.

Nas condições utilizadas os padrões apresentaram os seguintes tempos de retenção (min):

Padrão de ácido gálico: 6,83min; ácido ferrúlico: 20,07min; rutina: 25,027min; trans-cinâmico: 32,403min; campferol:37,083 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de microrganismos e substratos para produção de substâncias com ação antioxidante

A partir de 17 cepas de *Rhizopus* spp. foram selecionados os melhores produtores de substâncias com atividade antioxidante, através das fermentações (FES) utilizando como substrato grãos de soja. As linhagens selecionadas foram utilizadas nos estudos posteriores conforme apresentados anteriormente no item Materiais e Métodos

Todas as cepas apresentaram produções de antioxidantes, comparado com o teor de antioxidantes encontrado nos grãos de soja (29,11%). A Tabela 9 apresenta os resultados de atividade antioxidante em IC₅₀ (mg/mL), de produção de antioxidante de soja fermentada com *Rhizopus* em 36 h de fermentação, pois após este período ocorria a formação de esporos nos fermentados..

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos cálculos das porcentagens de atividades antioxidantes pela média das leituras de absorbâncias obtidos no espectrofotômetro, realizado pelo método de DPPH. T₀ representa a amostra no tempo zero h de fermentação.

Tabela.9. Atividade antioxidante da fermentação de diferentes cepas de diferentes extratos para seleção de linhagens de *Rhizopus*.

Amostra	Atividade antioxidante (%)		
	Etanol (%)	Água (%)	IC ₅₀ * (mg/mL)
T ₀ (tempo inicial)	29,11	-	265,75
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.17	56,17	-	141,64
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.11	61,00	-	91,60
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.15	62,19	-	125,66
<i>Rhizopus</i> - LPB-R.02	68,24	-	78,87
<i>Rhizopus</i> - LPB-R.01	70,71	-	110,56
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.10	72,02	-	105,16
<i>Rhizopus</i> - LPB- R. 16	72,05	-	109,23
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.07	73,27	-	115,22
<i>Rhizopus</i> - LPB-R.03	74,16	-	99,87
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.12	76,73	-	80,92
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.14	79,74	83,73	92,14
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.08	79,32	-	100,02
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.09	79,04	88,86	85,58
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.06	80,31	74,77	71,91
<i>Rhizopus</i> - LPB-R.04	80,85	82,67	77,90
<i>Rhizopus</i> - LPB-R.05	82,30	82,78	87,85
<i>Rhizopus</i> - LPB- R.13	82,44	73,78	93,22

T₀ – tempo antes da fermentação. IC₅₀: resultados obtidos da extração com etanol

As cepas que apresentaram maior capacidade de produção de substâncias com ação antioxidante foram *Rhizopus LPB-R.06* (80,31%), *Rhizopus LPB-R.04* (80,85%), *Rhizopus LPB-R.13* (82,44%), *Rhizopus LPB-R.05* (82,30%) e *Rhizopus LPB-R.09* (79,04%), obtidos pela extração com etanol 70%.

Apesar da amostra de *Rhizopus LPB-R.14* ter um resultado um pouco abaixo nesta extração do que o resultado da amostra de *Rhizopus LPB-R.13* (73,78% extração com água), os resultado do *Rhizopus LPB-R.14* o cálculo do IC₅₀ ficou um pouco melhor, e ainda os resultados da extração com água ultrapura foi melhor (83,73%), por isto para as etapas seguintes foram escolhidos : *Rhizopus LPB-R.04*, *Rhizopus LPB-R.05*, *Rhizopus LPB-R.06*, *Rhizopus LPB-R.09*, *Rhizopus LPB-R.14*.

IC₅₀ é a concentração inibitória, significa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração em 50% de radicais livres.

5.2. Fermentação com o fungo *Rhizopus* para verificar a influência da extração

5.2.1. Influência da extração das amostras fermentadas

Os resultados da influência da extração de diferentes proporções de amostra fermentada dos extratos com solução alcóolica, bem como o tempo de extração em agitador do tipo *shaker* (Tecnal modelo TE 420) para atividade antioxidante.

A Tabela 10 apresenta a variável resposta expressa em atividade antioxidante (%), determinado pelo método de DPPH, obtidos do delineamento experimental 2² (2 fatores, 2 níveis) e 3 pontos centrais com as variáveis independentes do tamanho da amostra (g) e tempo de extração (h).

Tabela 10. Resultados do delineamento experimental para o estudo da influência da extração de compostos antioxidantes da amostra fermentada na % de atividade antioxidante. Variáveis: proporção de amostra (g) e tempo de extração (h) para a resposta atividade antioxidante.

Experimento	Variáveis Independentes		Variável Resposta
	Amostra (g)	Tempo de extração (h)	Atividade Antioxidante (%)
1	3,0	2,0	83,5
2	3,0	1,0	83,0
3	1,0	2,0	41,0
4	1,0	1,0	40,5
5	2,0	1,5	51,5
6	2,0	1,5	52,5
7	2,0	1,5	52,0

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que as maiores % de atividades antioxidantes foram observadas nos experimentos 1 e 2, utilizando 3 g de

amostra fermentada, e 1h ou 2h de extração (1,0, 1,5 ou 2 horas). Conforme a Tabela 10 dos efeitos estimados obtidos na análise estatística (Anova) indicam que a variável amostra (g) apresenta diferença significativa ($0,011172^*$, ou seja, $p < 0,05$) na atividade antioxidante. Já o tempo de extração (h) não apresentou diferença significativa na atividade antioxidante dos extratos. Esse estudo indica que o tempo de extração estudado não influenciou no aumento ou na diminuição da extração dos compostos antioxidantes das amostras fermentadas. Esse estudo auxiliou na padronização do processo de extração sólido-líquido do presente trabalho de pesquisa. Assim, as extrações passaram a ser realizadas utilizando-se 3 g de amostra fermentada extraídas em 25 mL de etanol P.A. à 70% v/v por 1 hora de agitação.

A Figura 10 mostra a imagem dos sobrenadantes das amostras fermentadas em FES em diferentes tempos de fermentação.

Figura 10. Imagem dos sobrenadantes obtidos a partir dos extratos alcoólico das amostras fermentadas FES. Em cada frasco estão as amostras de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de fermentação, respectivamente.



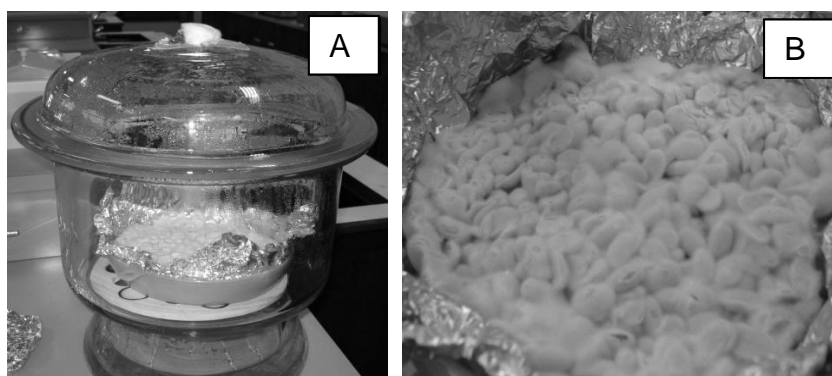
Os resultados mostraram que o tempo de extração não apresentou diferença significativa nos resultados, enquanto que, quanto maior a quantidade de amostra, melhor foi o resultado da extração, com valores de atividade antioxidante em torno de 85%.

Mesmo macerando a amostra antes de levar ao *shaker*, o melhor resultado obtido no planejamento experimental foi com maior quantidade de amostra em menor tempo sob agitação em shaker de bancada (marca Tecnal, mod. TE420) a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por 1 hora a 120 rpm.

5.2.2. Produção de Antioxidantes em FES de Grãos de Soja por *Rhizopus* LPB-R.05

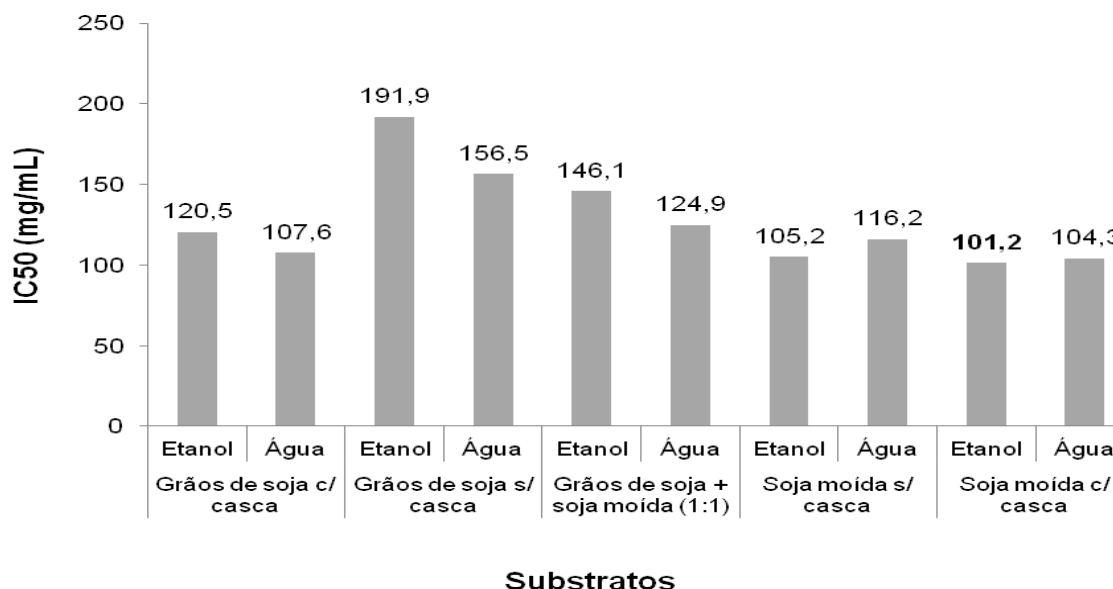
A Figura 11 mostra a imagem da fermentação no estado sólido (FES) conduzida em bandejas acondicionadas dentro de um dessecador e incubada dentro da estufa bacteriológica à 30°C.

Figura 11. Dessecador (A) e bandeja com FES de; *Rhizopus* sp.- LPB-R.05. (B) Imagem da FES de 36 horas em grãos de soja pela mesma linhagem fúngica.



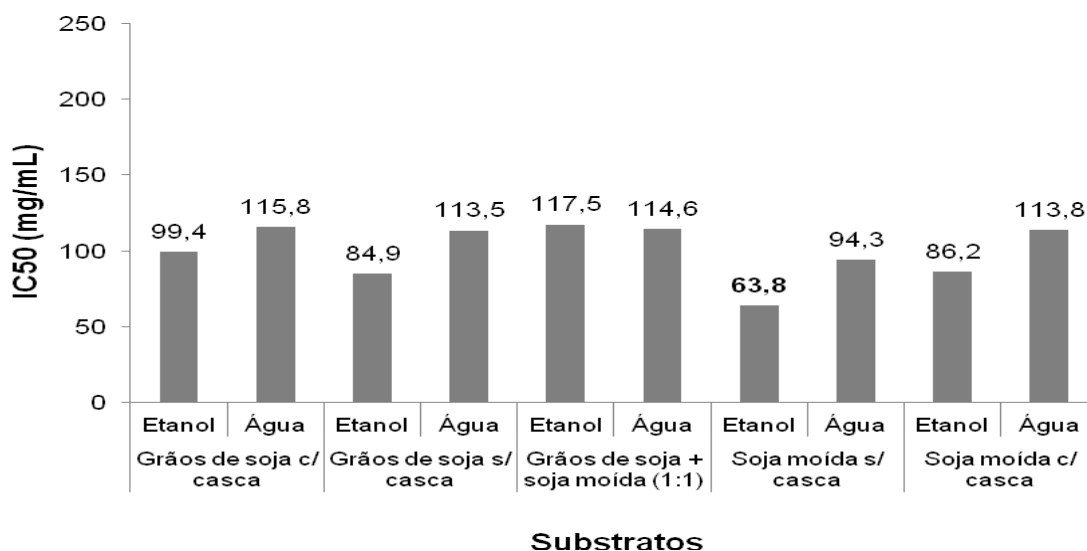
Os resultados da atividade antioxidante do fermentado por *Rhizopus* LPB-R.05 em FES realizado dentro do dessecador na estufa bacteriológica para manter a temperatura, foram feitas as extrações alcoólicas e aquosas. Dentre os experimentos realizados, o melhor resultado de IC₅₀ foi de 101,2 mg/mL obtido utilizando grãos de soja moída com casca com extração etanólica. Este dado significa que são necessárias 101,2 mg desta amostra fermentada (na base úmida) para reduzir 50% dos radicais livres analisados pelo método de DPPH. O segundo melhor resultado foi na mesma condição de fermentação porém a extração aquosa, onde obteve (104,3 mg/mL).

Figura 12. Resultados de concentração inibitória (IC_{50} , em mg/mL) das amostras fermentadas por *Rhizopus sp.*- LPB-R.05 em grãos de soja conduzidas em bandejas dentro de dessecador incubado em estufa bacteriológica.



Já a Figura 13 mostra que as FES conduzidas em bandejas colocadas diretamente dentro da estufa bacteriológica, apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante quando comparados aos resultados apresentados na Figura 12 (FES em dessecador dentro da estufa). O melhor resultado foi obtido utilizando como substrato grãos de soja moídos sem casca (IC_{50} igual a 63,8 mg/mL) extraídos com etanol.

Figura 13. Resultados de concentração inibitória (IC_{50} , em mg/mL) das amostras fermentadas por *Rhizopus sp.*- LPB-R.05 em grãos de soja conduzidas em bandejas incubadas em estufa bacteriológica.



Visualizando os resultados apresentados no gráfico da figura 13 observa-se maior eficiência da atividade antioxidante quando a extração foi feita com etanol, com o resultado de IC_{50} 63,8mg/mL, e o melhor resultado obtido (pela extração com água foi de IC_{50} 94,3mg/mL.

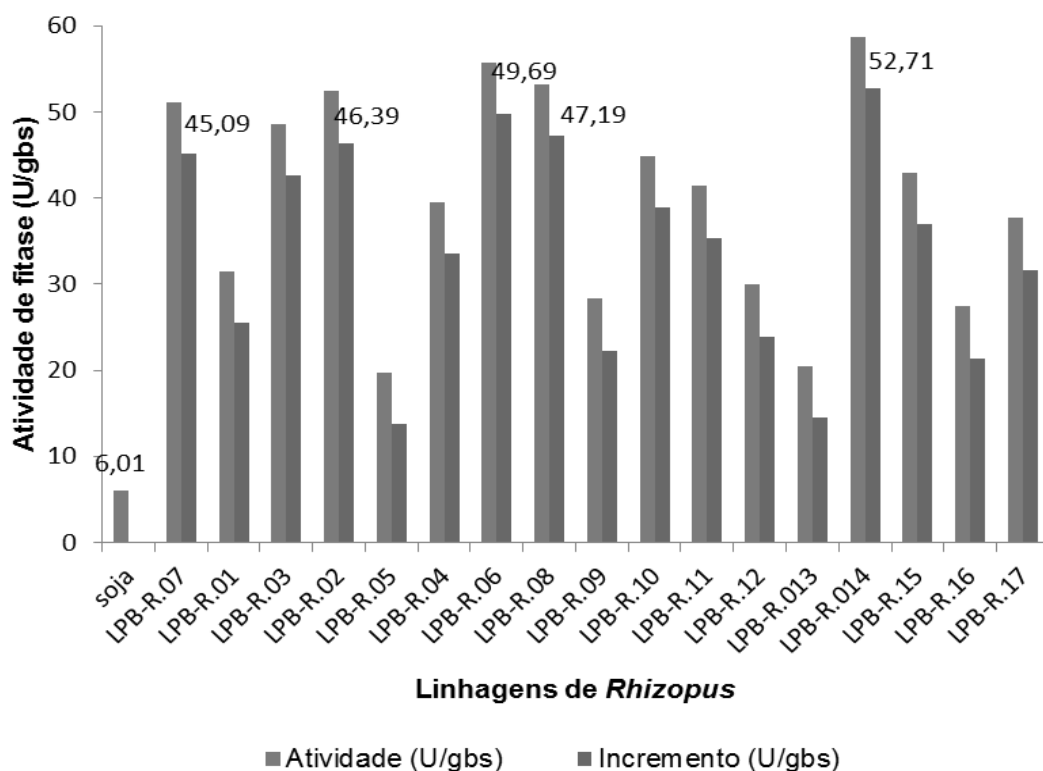
A partir deste experimento concluiu-se que as FES conduzidas em bandejas diretamente em estufa resultaram em melhor produção de atividade antioxidante por *Rhizopus LPB-R.05* Sendo assim, foi definido que para os estudos posteriores de FES seriam utilizados grãos de soja moída com casca para a seleção das melhores linhagens produtoras de substâncias bioativas com ação antioxidante. As fermentações seriam realizadas em bandejas com o substrato sólido diretamente dentro da estufa bacteriológica anexas a recipientes de água para manter a umidade dentro da estufa, como acontece com a umidade dentro do dessecador.

5.2.3. Resultados da Produção de Fitase por linhagens de *Rhizopus sp.*

A Figura 14 abaixo apresenta os resultados da atividade de fitase das amostras fermentadas bem como o incremento de atividade de fitase durante as

FES por 17 linhagens de *Rhizopus spp.* em grãos de soja como substrato. É importante salientar que a atividade fitásica demonstra possível degradação do fator antinutricional ácido fítico presente em grãos de cereais como a soja.

Figura 14. Atividade de fitase (U/gbs) e o incremento da atividade de fitase em FES por linhagens de *Rhizopus spp.* em grãos de soja como substrato.



Os fermentados de soja com *Rhizopus* apresentaram incremento na atividade de fitase que variaram entre 13,7 U/gbs e 52,7 U/gbs. A melhor linhagem produtora de fitase foi *Rhizopus* LPB-R.14 atingindo a produção de 58,70 U/gbs, porém descontando a atividade no tempo 0 horas de fermentação (6,01 U/gbs) o incremento da atividade de fitase durante 72 h de fermentação foi de 52,7 U/gbs. Portanto, a linhagem *Rhizopus* LPB-R.14 apresentou maior capacidade de produção de fitase. Isso pode ser observado pelo maior valor obtido de incremento de atividade de fitase durante a FES (Figura 14). Desta forma, maior foi a capacidade desta linhagem em degradar o antinutriente (ácido fítico), biodisponibilizando proteínas, minerais além da liberação de fósforo inorgânico. Em segundo lugar a

linhagem *Rhizopus LPB-R.06* com produção de 49,7 U/gbs, seguida por *Rhizopus LPB-R.08* com 47,2 U/gbs. Em quarto e quinto lugares, respectivamente, as linhagens *Rhizopus LPB-R.02* e *LPB-R.07*, com produções de 46,4 e 45,1 U/gbs.

Os resultados da produção de fitase por FES já reportados na literatura estão apresentados na Tabela 11 e compara as produções alcançadas na literatura utilizando o mesmo processo de fermentação (FES) com os obtidos no presente trabalho.

Tabela 11. Produção de fitases fúngicas por FES

Microrganismo	Substrato	Fitase	Referências
		(U/gbs) *	
<i>Aspergillus niger</i> FS3	Polpa cítrica	93	SPIER <i>et al.</i> (2011)
<i>A. ficcum</i>	Polpa cítrica + farelo soja	26	SPIER <i>et al.</i> (2008)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	154	BHAVSAR <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas</i> AP-MSU	Farinha de mandioca	73	ESAKKIRAJ <i>et al.</i> (2010)
<i>Malbranchea sulfurea</i>	Farelo de trigo	2,84	EL-GINDY <i>et al.</i> (2009)
<i>A. niveus</i>	Farelo de milho	3,4	EL-GINDY <i>et al.</i> (2009)
<i>A. oryzae</i>	Soja e arroz	16	CHANTASARTRASAMEE <i>et al.</i> (2005)
<i>Trametes versicolor</i>	Farelo de trigo	134,53	SALMON <i>et al.</i> (2011)
<i>R. oligosporus</i>	Resíduo de coco	14,29	SABU <i>et al.</i> (2002)
<i>R. oryzae</i> NRRL 1891	Torta de coco	30,1	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizopus LPB-R.14</i>	Soja	52.7	Neste presente trabalho

* (U/gbs) = Unidades por grama em base seca.

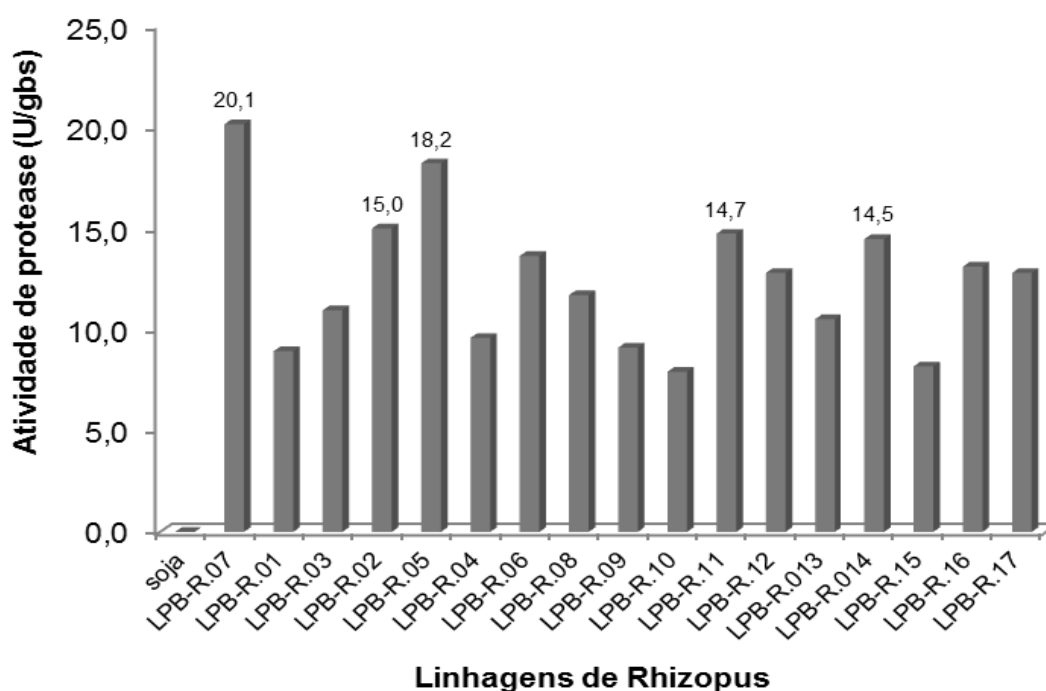
Segundo RAMACHANDRAN *et al.* (2005) a linhagem de *R. oryzae* NRRL 1891 produziu 30,1 U/gbs de fitase em torta de coco. Este estudo não apresentou o uso de soja ou torta de soja para fermentação de *Rhizopus* objetivando a produção de fitase para comparação com resultados desta dissertação. Segundo Spier *et al.* (2011) utilizando polpa cítrica mais farelo de soja, fermentando com o fungo *aspergillus ficum* obteve a produção de 26 U/gbs, e CHANTASARTRASAMEE *et al.* Utilizando soja e arroz como substrato e com o fungo *Aspergillus oryzae* conseguiu uma produção de 16U/gbs, isto significa que os resultados obtidos neste trabalho

(52,7 U/gbs), foram superiores que os resultados obtidos por outros autores utilizando o resíduo de soja.

5.2.4. Resultados da Produção de Proteases durante a FES por linhagens de *Rhizopus*

As análises de proteases foram realizadas em fermentações com as 17 cepas de *Rhizopus*, com substratos de soja. O melhor tampão para extração de protease foi NaCl 2% com pH 6,0, que foram utilizados nestas análises. O gráfico da Figura 15 apresenta os resultados da produção de proteases por linhagens de *Rhizopus* spp. Como observado, as produções de proteases variaram de 7,9 a 20,1 U/gbs

Figura 15. Resultados da atividade proteásica nas FES por *Rhizopus* em grãos de soja como substrato



A atividade de proteases no tempo inicial de fermentação (0 h) foi equivalente a 0,0 U/gbs. A maior produção de proteases foi alcançada pela linhagem *Rhizopus* LPB-R.07 (20,1 U/gbs) seguido de *Rhizopus* LPB-R.05 (18,2 U/gbs) e por *Rhizopus* LPB-R.02 (15,0 U/gbs). Os resultados de atividade de protease aqui apresentados são real incrementos de atividade de proteases durante a FES. É possível sugerir

que as atividades de proteases determinadas foram sintetizadas pelas linhagens fúngicas durante o processo de FES em grãos de soja como substrato em 72 horas de fermentação.

A tabela 12 reporta atividades de proteases fúngicas de vários trabalhos da literatura, comparado com o resultado obtido neste presente trabalho.

Tabela 12. Produção de proteases fúngicas por FES relatadas na literatura

Micro-organismo	Substrato	Protease (U/gbs)	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Torta de girassol	270	CASTRO (2009)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Arroz	14,9	IKASARI e MITCHELL (1996)
<i>Rhizopus oligosporus</i> M 30	Mel de soja	15,6	IRFAN, <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus arrhizus</i> M26	Mel de girassol	13,6	IRFAN, <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus oligosporus</i> NRRL 2710	Soja	25,0	WANG, <i>et al.</i> (1974)
<i>M. dispersus</i> NRRL 3103	Soja	113,8	WANG, <i>et al.</i> (1974)
<i>Rhizopus</i> sp.- LPB-R.07	Soja	20,1	Neste presente trabalho

WANG *et al.* (1974), utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 e o substrato de soja produziu 25 U/gbs, enquanto neste trabalho foi produzido 20,1U/gbs com mesmo substrato e com *Rhizopus* LPB-R.07. Significa que o resultado obtido neste trabalho foi significativo, produzindo valores próximos ao reportado por WANG *et al* (1974).

5.2.5. Seleção do Melhor Substrato para a Produção de Antioxidante

Os substratos utilizados nesta pesquisa foram: a soja, arroz integral, mistura de arroz integral (arroz 7 grãos), aveia, bagaço de cana, cevada, farelo de soja, farinha de mandioca, milho e trigo. Estes substratos foram utilizados nas fermentações (FES) com cinco linhagens de fungos selecionadas nas fermentações anteriores: *Rhizopus* LPB-R.09, *Rhizopus* LPB-R.05, *Rhizopus* LPB-R.06, *Rhizopus* LPB-R.04, *Rhizopus* LPB-R.14 para verificar a produção de substâncias com ação

antioxidante. Dos substratos utilizados que apresentaram maior capacidade de produção de substâncias antioxidantes, foram realizadas cinéticas do processo fermentativo para verificar o melhor tempo de produção do antioxidante e consequentemente a maior produção.

5.2.6. Avaliação da Mistura de Cereais na Produção de Substâncias Antioxidantes por FES utilizando Cepas de *Rhizopus* Pré-selecionadas

A Tabela 13 apresenta os resultados das amostras determinados pelo método de DPPH, o resultado dado em IC₅₀ (mg/mL), das amostras fermentadas (FES) com mistura de soja com diferentes substratos, utilizando linhagens de *Rhizopus* LPB-R.09, *Rhizopus* LPB-R.05, *Rhizopus* LPB-R.06, *Rhizopus* LPB-R.04, *Rhizopus* LPB-R.14. Estes fermentadas foram extraídas com etanol a 70% e água ultrapura.

Tabela 13. Resultados de IC₅₀ mg/mL do extrato com etanol 70% e água de amostras fermentadas em FES com diferentes substratos utilizando diferentes linhagens de *Rhizopus*. .

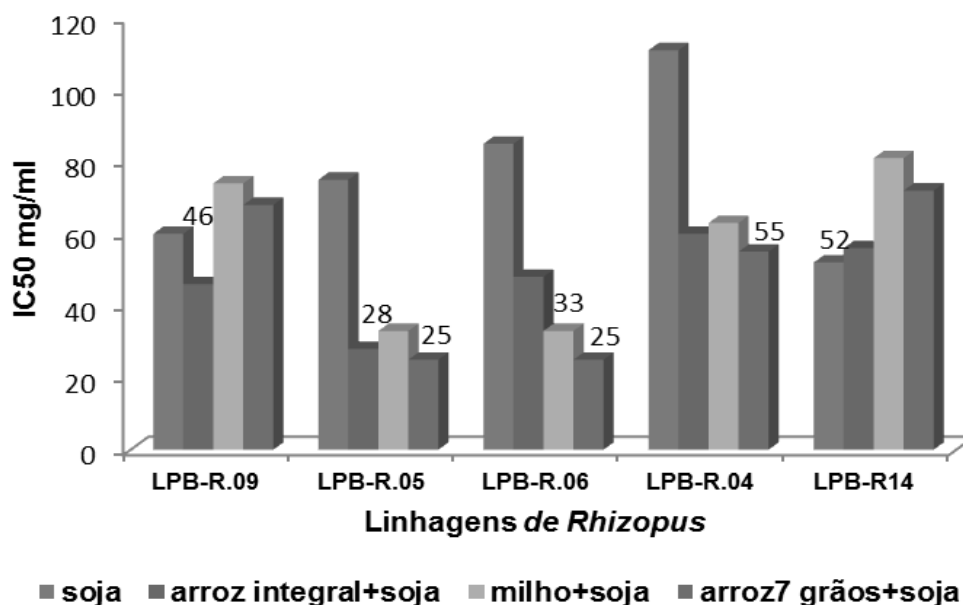
		Linhagens de <i>Rhizopus</i> sp.				
	Extração	<i>Rhizopus</i> LPB-R.09	<i>Rhizopus</i> LPB-R.05	<i>Rhizopus</i> LPB-R.06	<i>Rhizopus</i> LPB-R.04	<i>Rhizopus</i> LPB-R.14
Soja	Etanol	60	75	85	111	52
	Água	90	108	107	109	110
Soja + Mistura de arroz 7grãos	Etanol	68	25	25	55	72
	Água	110	85	94	85	57
Soja + Arroz integral	Etanol	46	28	48	60	56
	água	81	82	82	67	68
Soja + Milho	álcool	74	33	33	63	81
	água	62	84	84	88	118
Soja + Cevada	álcool	75	73	57	62	70
	água	120	81	105	102	72
Soja + Trigo	álcool	75	63	50	58	68
	água	99	103	108	77	35
Soja + Bagaço de Cana	álcool	128	64	106	64	108
	água	110	93	96	110	74
Soja + Farelo de	álcool	84	53	37	59	136

Linhagens de <i>Rhizopus</i> sp.						
Extração		<i>Rhizopus</i> LPB-R.09	<i>Rhizopus</i> LPB-R.05	<i>Rhizopus</i> LPB-R.06	<i>Rhizopus</i> LPB-R.04	<i>Rhizopus</i> LPB-R.14
Soja	água	82	97	86	91	93
Soja + Farinha	álcool	161	97	167	135	137
de Mandioca	água	325	209	231	251	251
Soja + Aveia	álcool	84	83	60	117	140
	água	169	99	119	129	130
BHA = 0,44mg/ml						

Na tabela 13 está apresentados os resultados das fermentações com diferentes cepas e substratos, onde podemos notar que os melhores resultados foram obtidos com as cepas *Rhizopus* LPB-R.05 e LPB-R.06 com o substrato misto. O gráfico da Figura 16 mostra a comparação dos resultados da FES com 5 cepas: *Rhizopus* LPB-R.09, *Rhizopus* LPB-R.05, *Rhizopus* LPB-R.06, *Rhizopus* LPB-R.04, *Rhizopus* LPB-R.14 , utilizando-se mistura de soja com diferentes substratos. Considerando as 5 cepas testadas, com diferentes substratos, as maiores produtoras de substâncias antioxidantes foram encontradas com fermentações com os substratos: soja misturada com arroz integral, soja + mistura de arroz 7 grãos e soja + milho . A cepa *Rhizopus* LPB-R05, apresentou melhores resultados de IC₅₀ (25 mg/mL em soja + arroz 7 grãos; 28 mg/mL em soja + arroz integral e 33 mg/mL em soja + milho), e o segundo melhor resultado foi encontrado com a cepa *Rhizopus* LPB-R.06 (IC₅₀: 25 mg/mL em soja + mistura de arroz (7 grãos); 33 mg/mL em soja + milho e 48 mg/mL em soja + arroz integral). A melhor produção apresentou aproximadamente 33% a mais da produtividade de atividade antioxidante com a fermentação conduzida com apenas soja como substrato. Desta fermentação foram selecionadas as 2 melhores linhagens (*Rhizopus* LPB-R.05 e *Rhizopus* LPB-R.06) para a próxima etapa de FES e FSm, para verificar se os substratos fermentados isoladamente também eram adequados para a produção de substâncias com atividade antioxidante.

As extrações alcólicas realizadas apresentaram os melhores resultados de IC₅₀ quando comparados aos resultados obtidos às extrações feitas com água.

Figura 16. Comparação da FES com 5 linhagens selecionadas de *Rhizopus sp.* em diferentes substratos.



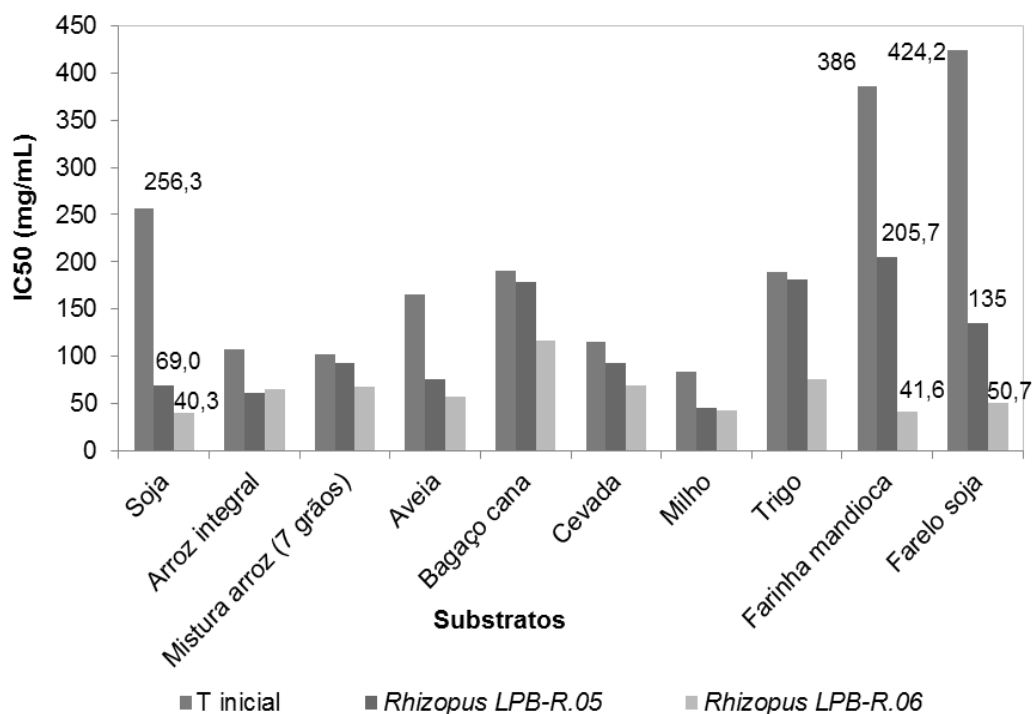
No processo de FES utilizando-se substratos mistos o melhor resultado foi obtido com soja + mistura de arroz (7 grãos). Como a mistura de arroz (arroz 7 grãos) tem um custo mais elevado, para as próximas etapas foram definidos os estudos utilizando-se as misturas soja + arroz integral e mistura soja + milho, utilizando as cepas selecionadas *Rhizopus* LPB-R.05 e *Rhizopus* LPB-R.06. Essas duas cepas são linhagens utilizadas na produção de tempeh, como a finalidade deste trabalho, é para fins alimentícios ou cosméticos, foram utilizadas as mesmas cepas.

5.2.7. Fermentação no Estado Sólido (FES) com Diferentes Substratos

Nesta etapa foram escolhidas duas cepas: *Rhizopus* LPB-R.05 e *Rhizopus* LPB-R.06, para realização desta fermentação com substratos isolados, para verificar a produção de substâncias com atividade antioxidante comparando-os com os resultados obtidos de fermentado com substratos mistos. A figura 17 apresenta os

resultados de atividade antioxidante (IC_{50}) pelas linhagens *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06*.

Figura 17. A atividade antioxidante analisado pelo método de DPPH expressa em (índice IC_{50} em mg/ml) de extratos obtidos pelas linhagens *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06* em FES



Tinicial = atividade antioxidante do substrato não fermentado

A Figura 17 mostra que alguns substratos como soja, milho e farinha de mandioca fermentados isoladamente apresentaram resultados promissores em relação com substratos mistos com soja. Mostra também que todos os substratos não fermentados apresentaram um pouco de atividade, apesar de alguns serem pouco significativos. Os resultados da FES pela cepa *Rhizopus LPB-R.06* apresentaram melhores resultados em soja com (IC_{50} : 40,34 mg/mL); farinha de mandioca (IC_{50} : 41,57 mg/mL) e milho (IC_{50} : 42,88 mg/mL); e *Rhizopus LPB-R.05* com milho (IC_{50} : 44,62 mg/mL). O pior resultado foi obtido com bagaço de cana utilizado como substrato para a FES, visando aumentar a aeração, quando utilizado outros substratos, evitando a compactação e aumentando a superfície de contato do fungo com o substrato.

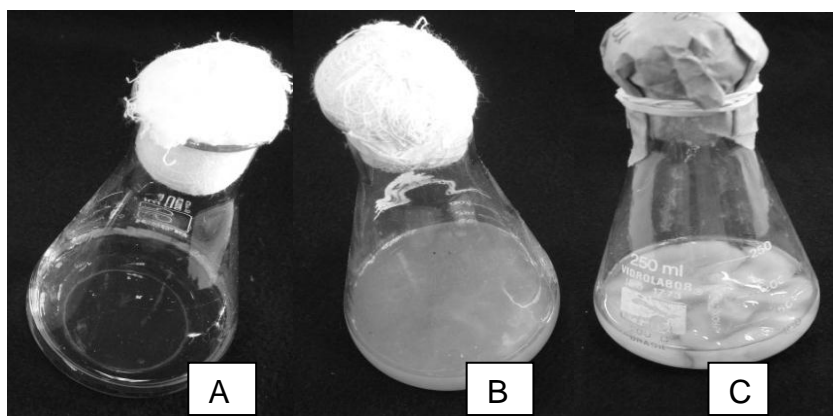
WANG *et al.* (2007) encontraram atividade antioxidante em fermentado de Douchi (fermentado de soja com sal) com *aspergillus oryzae*, equivalente ao índice IC_{50} 14,7 μ g/mL, sendo este o valor citado foi superior aos obtidos neste estudo que o melhor resultado foi de soja com IC_{50} 40,3mg/mL.

ESAKI, et al. (2001), encontrou IC_{50} de 50 mg/100g de matéria seca em tempeh com soja fermentado com *Rhizopus oligosporus* IFO32002 e 32003, em fermentação de 4 dias.

5.2.8. Estudo de Fermentação Submersa (FSm) com Extratos aquoso de diferentes Substratos

A Figura 18 apresenta a imagem das fermentações submersas (FSm) de extrato aquoso de soja conduzidas em frascos Erlenmeyer por *Rhizopus LPB-R.05*, sendo A) extrato aquoso da soja, B) fermentação 24 h e C) fermentação 72 h.

Figura 18. Imagem das FSm por *Rhizopus LPB-R.05* A) extrato aquoso de soja; (B) crescimento do micélio de 24 h e (C) crescimento de micélio com 72 h de fermentação.

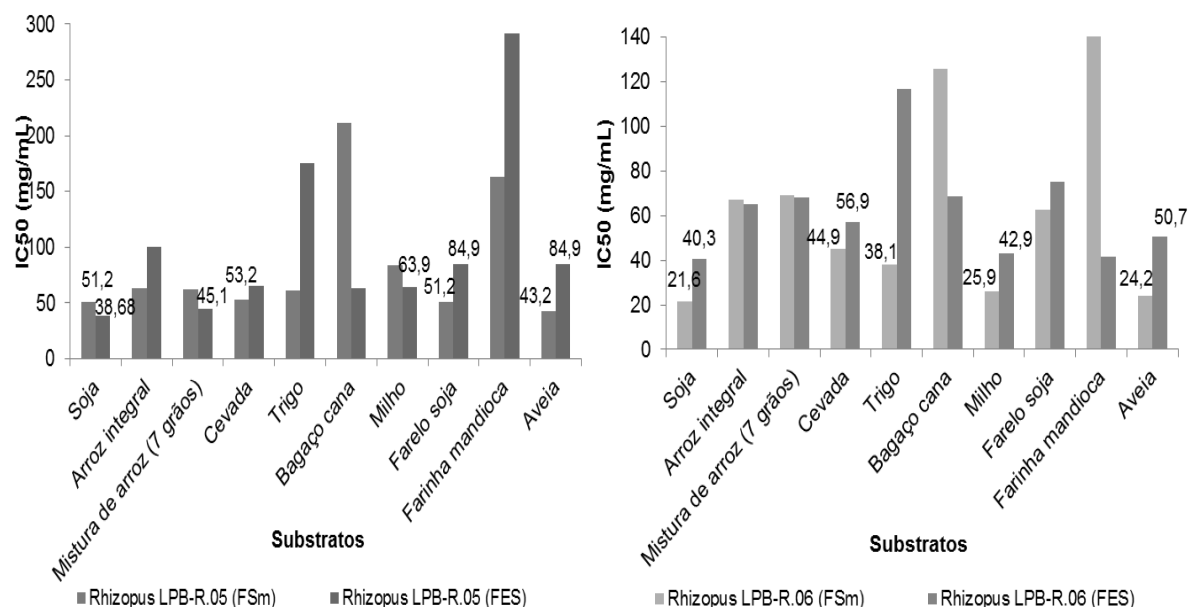


Como pode ser observado na Figura 17, os resultados das atividades antioxidantes expressa em IC_{50} das FSm apresentaram bons resultados quando comparados aos índices IC_{50} das FES, porém os tempos de fermentações para se obter maiores atividades antioxidantes são maiores em FSm do que os tempos de FES, mesmo apresentando valores melhores a fermentação sólida é mais rápida na produção de antioxidante, geralmente de 24 a 48 h de fermentação, entretanto a

fermentação líquida, apresenta boa produção de antioxidantes a partir das 96h, e para os substratos de soja, aveia, cevada e trigo, aos 48h já havia uma boa produtividade.

Na figura 19 está representada os resultados obtidos pela FES e FSm, em diferentes substratos utilizados com diferente linhagens de fungos utilizados neste trabalho.

Figura 19. Produção de atividade antioxidante expressa em IC₅₀ de FES (48 h de fermentação) e FSm (96 h de fermentação) pelas linhagens de *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06* utilizando diferentes substratos.



Verifica-se que nos dois processos fermentativos (FES e FSm) teve uma produtividade com valores consideráveis. A FSm apresenta melhores resultados de atividade antioxidante embora a produção ocorra em tempo de fermentação superiores (os resultados acima referem-se a 96 horas de fermentação) quando comparada aos estudos em FES com fermentação de 48h, (resultados são expressos em IC₅₀). No processo de FSm, praticamente não houve esporulação fúngica devido ao crescimento do fungo ocorrer em meio líquido durante o tempo do processo, já na FES, após 30 h de fermentação já começa ocorrer a esporulação.

As FSm realizadas apresentaram bons resultados quando comparados aos resultados obtidos pelo processo de FES (Figura 19). O maior incremento de

produção de compostos com ação antioxidantes foi obtido em FSm com a linhagem *Rhizopus LPB-R.06* com os seguintes substratos: soja (IC_{50} 21,6 mg/mL), aveia (IC_{50} : 24,2mg/mL), milho (IC_{50} 25,1mg/mL). Mesmo nas fermentações FES utilizando substratos separadamente, os melhores resultados foram obtidos com soja (IC_{50} 38,68 mg/mL), arroz mistura (7 grãos) (IC_{50} 45,1 mg/mL) por *Rhizopus LPB-R.05* e milho (IC_{50} 42,9 mg/mL) com *Rhizopus LPB-R.06*.

LEE *et al.* (2008) obtiveram uma atividade antioxidante equivalente a IC_{50} de 3,83 mg/mL em extrato aquoso de soja fermentada por 7 dias à 25°C com *Monascus* MFS-31499. Como pode ser observado este valor referenciado é superior quando comparado com o melhor valor obtido neste trabalho (IC_{50} de 21,8 mg/mL) em fermentado de soja utilizando a cepa *Rhizopus LPB-R.06*, entretanto os valores obtidos neste trabalho também se mostram promissores.

Os resultados da FSm foram satisfatórios quando comparados aos resultados de IC_{50} das FES obtidos anteriormente. Nas FSm os melhores resultados da atividade antioxidante (índice IC_{50}) foram alcançados pela linhagem *Rhizopus LPB-R.06* (IC_{50} : 21,59 mg/mL), utilizando soja como substrato. O segundo melhor resultado foi obtido com milho (IC_{50} : 24,23 mg/mL) e o terceiro melhor resultado obtido com aveia (IC_{50} : 5,93 mg/mL), ambos obtidos com a mesma linhagem. Apesar de algumas linhagens terem crescido mais lentamente nas FSm líquidas, os resultados das atividades antioxidante também foram melhores no tempo superior de fermentação quando comparado aos resultados das FES. Os melhores resultados de atividade antioxidante expressos em IC_{50} (lembrando que quanto menor o valor do índice melhor é a atividade antioxidante) foram obtidos com soja, cevada, trigo, milho e aveia expressos em IC_{50} em 48 h de fermentação. Os estudos de FSm que tiveram duração de 96 horas no total, não foram melhores nos tempos entre 48 e 96 h.

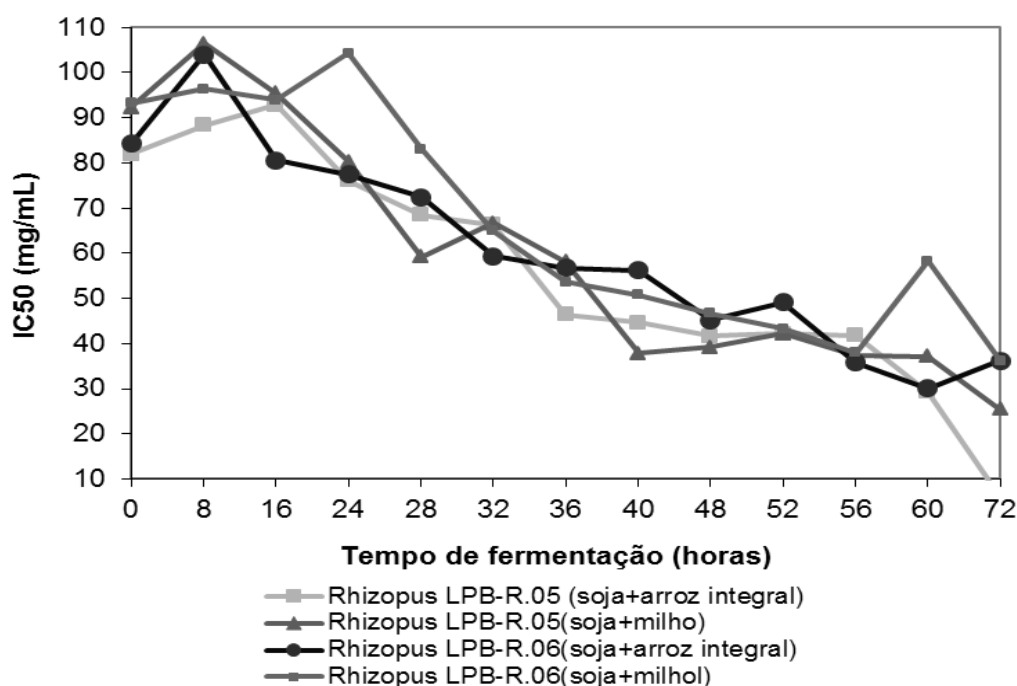
MONAJJEMI *et al.* (2012) estudando um fermentado com soro de leite de soja, fermentado com cultura mista de Kefir (*Lactobacillus* e leveduras) por 48 h, alcançaram produção de antioxidante expressivo (IC_{50} 5,0 mg/mL), indicando ter um excelente poder redutor de radical livre.

5.3. Cinética Final do Processo Fermentativo com as Melhores Linhagens Produtoras de Substâncias com Atividade Antioxidante

Os resultados da cinética de FES foram obtidos com as cepas de *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06*, com os substratos selecionados (soja + arroz integral, soja + milho). A FES foi escolhida como o processo fermentativo promissor para a produção de substâncias antioxidantes, pois apresentou maior produção quando comparada aos resultados obtidos pela FSm. Os substratos selecionados foram as misturas na proporção de 1:1 em massa: soja e arroz integral, e soja mais milho.

Figura 20 apresenta os resultados da produção de substâncias com ação antioxidante, extraídos com etanol 70%, analisado pelo método DPPH produzidas em FES com misturas selecionadas soja + arroz integral e soja + milho pelas linhagens previamente selecionadas *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06*. As atividades antioxidantes estão expressas em IC₅₀.

Figura 20. Resultados da atividade antioxidante de extrato alcóolico pelo método de DPPH das amostras de fermentado com *Rhizopus LPB-R.05* e *Rhizopus LPB-R.06* em substratos com soja e arroz integral e soja com milho ao longo do tempo de fermentação



A figura 20 apresenta os resultados obtidos nos extratos alcóolicos dos fermentados no tempo de fermentação de 72 h, as amostras foram tiradas a cada 8 h (noite) e a cada 4 h (dia). Os melhores resultados obtidos de índices IC₅₀ foram alcançados com *Rhizopus LPB-R.05* em FES utilizando mistura soja e arroz integral (IC₅₀: 6,16 e 56,23 mg/mL) e da FES utilizando mistura de soja e milho (IC₅₀: 25,49 e 36,20 mg/mL), com extração com álcool e água respectivamente. A atividade antioxidante de aproximadamente 75% foi alcançada em FES utilizando mistura de soja com arroz integral por *Rhizopus LPB-R.05* e 64% com *Rhizopus LPB-R.06*.

Ainda podemos observar na Figura 20 que conforme a fermentação avançava a produção de substâncias com ação antioxidante era aumentada visivelmente. Quanto menor o valor de IC₅₀ maior é a produção dos compostos com ação antioxidante, apesar de em alguns momentos os resultados terem apresentado uma pequena oscilação no IC₅₀, que é devido a pouca diferença entre as leituras de antioxidante e porcentagens. Porém ao plotarmos o gráfico a equação da reta pode fornecer coeficientes diferentes que resultam em valores diferentes de IC₅₀.

Por apresentar bons resultados nas FES pela linhagem de *Rhizopus LPB-R.05* utilizando a mistura de substratos soja + arroz integral. Esta linhagem e esta mistura foram definidas para a realização da cinética final do processo fermentativo.

Tabela 14. Produção de atividade antioxidante em fermentados de soja com fungos, descritos na literatura.

FUNGO	SUBSTRATO	IC ₅₀ (mg/mL)	TEMPO FERMENTAÇÃO	AUTOR
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sufu (arroz e soja)	19,1	16 dias	Huang <i>et al.</i> , (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> 3951	Douche (soja)	0,658	60 horas	Wang <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus awamori</i>	Koji (soja)	2,40-7,43	3 dias	Lin <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	Natto-tempeh (soja)	17,64	5 dias	Huang (2008)
<i>Rhizopus oligosporus</i> BCRC	Tempeh (soja)	13,7	5 dias	Chang <i>et al.</i> (2008)

FUNGO	SUBSTRATO	IC ₅₀ (mg/mL)	TEMPO FERMENTAÇÃO	AUTOR
31750				
<i>Rhizopus stolonifer</i> LAU 07	Fermentado de Casca de cacau	5,5	48 horas	Lateef <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus sp.</i> - LPB-R.05	Mistura de soja e arroz integral	6,16	72 horas	Neste presente trabalho

A tabela 14 mostra alguns organismos produtores de compostos com ação antioxidante e seus substratos. O melhor resultado encontrado foi pelo (WANG, *et al*, 2007) obtido pelo *Aspergillus oryzae* 3951 fermentado em soja, encontrando IC₅₀ de 0,65mg/mL. CHANG, *et al.*,(2008) e Huang (2008), nos trabalhos de tempeh, a soja fermentada com *Rhizopus oligosporus* e mistura de *Rhizopus oligosporus* e *Bacillus subtilis* foi encontrado o valor de IC₅₀ 13,7mg/mL e IC₅₀ 17,64mg/mL, respectivamente. Já o resultado encontrado neste trabalho (IC₅₀: 6,16mg/mL) foi inferior ao resultado encontrado por WANG *et al.* (2007), mas o resultado encontrado nesta pesquisa foi superior ao encontrado pelos autores HUANG (2008) e CHANG *et al.* (2008), nas fermentações de Natto-Tempeh e tempeh, respectivamente.

A partir do melhor microrganismo produtor de substâncias antioxidantes, o *Rhizopus LPB-R.05* e com o melhor substrato selecionado mistura de 1:1 de soja e arroz integral, foi realizada uma cinética da fermentação com os seguintes resultados.

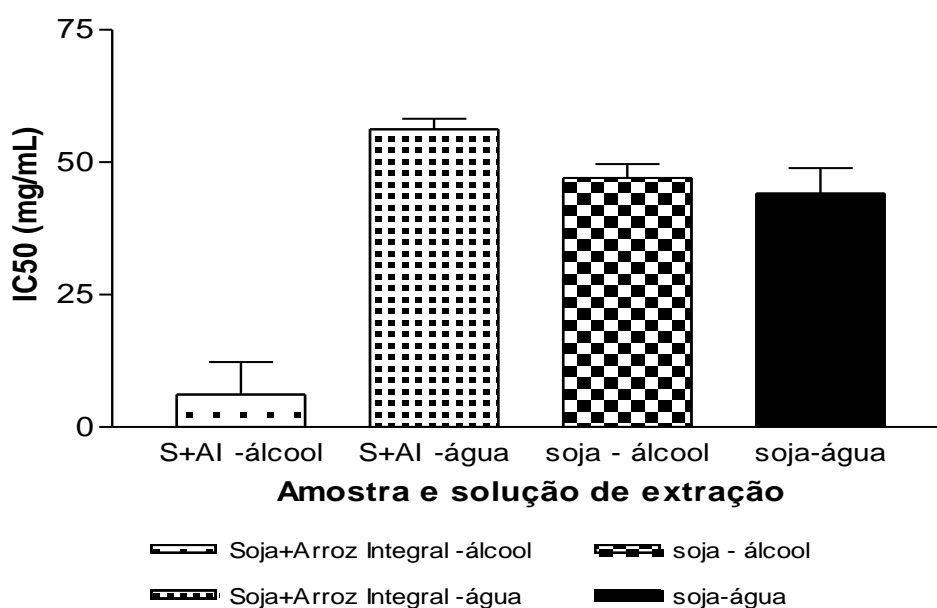
5.3.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH

Na figura 21 estão representados os resultados da comparação dos extratos aquosos e alcóolicos das amostras de soja e soja + arroz integral fermentadas com *Rhizopus LPB-R.05* em FES, avaliados pelo método de DPPH.

As amostras apresentadas na figura 21 foram submetidas às análises estatísticas: análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tuckey utilizando o programa PRISMA® (GraphPad Prism 5 for Windows, version 5.4). Estão apresentadas as média dos resultados das análises de IC₅₀ (mg/mL) seguidas pelo desvio padrão das amostras. Ainda é possível avaliar que ao longo do tempo de

fermentação, a produção de substâncias com ação antioxidante aumenta. Os valores obtidos de IC_{50} são calculados e observa-se que quanto menor o IC_{50} , maior a produtividade de antioxidante. Lembrando que o IC_{50} de BHA é 0,44 mg/mL, e soja mais o arroz integral fermentado teve IC_{50} de 6,16 mg/mL com amostras extraídas com etanol P.A. a 70% v/v, conforme mostrado na figura 21.

Figura 21. Resultados da comparação da produção de antioxidantes nas amostras de soja e soja + arroz integral fermentadas em FES por *Rhizopus LPB-R.05* em 72 h de fermentação.



Dos dados mostrados na figura 20, pode ser observado que no decorrer do tempo de fermentação, ocorre o incremento da atividade antioxidante ocorrendo o aumento da produção de antioxidante, sendo mais evidenciado a partir de 40 h de fermentação. A produção máxima ocorreu em 72 h de fermentação (IC_{50} : 6,16 mg/mL), pois após este tempo a produção de antioxidante sofre pequenas oscilações (o acompanhamento foi realizado até 72 h de fermentação, já que a % de atividade antioxidante se estabilizaram após um determinado tempo de fermentação). Isto significa que a fermentação da soja com fungos do gênero *Rhizopus* é um ótimo meio para aumentar os compostos bioativos como as substâncias antioxidantes.

Durante a realização dos experimentos, foi observado que muitas amostras fermentadas apresentaram valores de atividade antioxidante (%) muito similares, e que a faixa entre 88 e 90% era frequente para várias amostras.

O método descrito por BRAND-WILLIAMS (1994) apresenta uma limitação para a detecção de antioxidantes, pois existe um limite de redução do padrão BHA, após um determinado tempo de reação utilizando o reativo DPPH, ou seja, substâncias com maior capacidade antioxidante (ou maiores concentrações dessas substâncias) tendem a um patamar constante após um determinado tempo de reação (30 min) à temperatura ambiente e ao abrigo da luz conforme o método descrito.

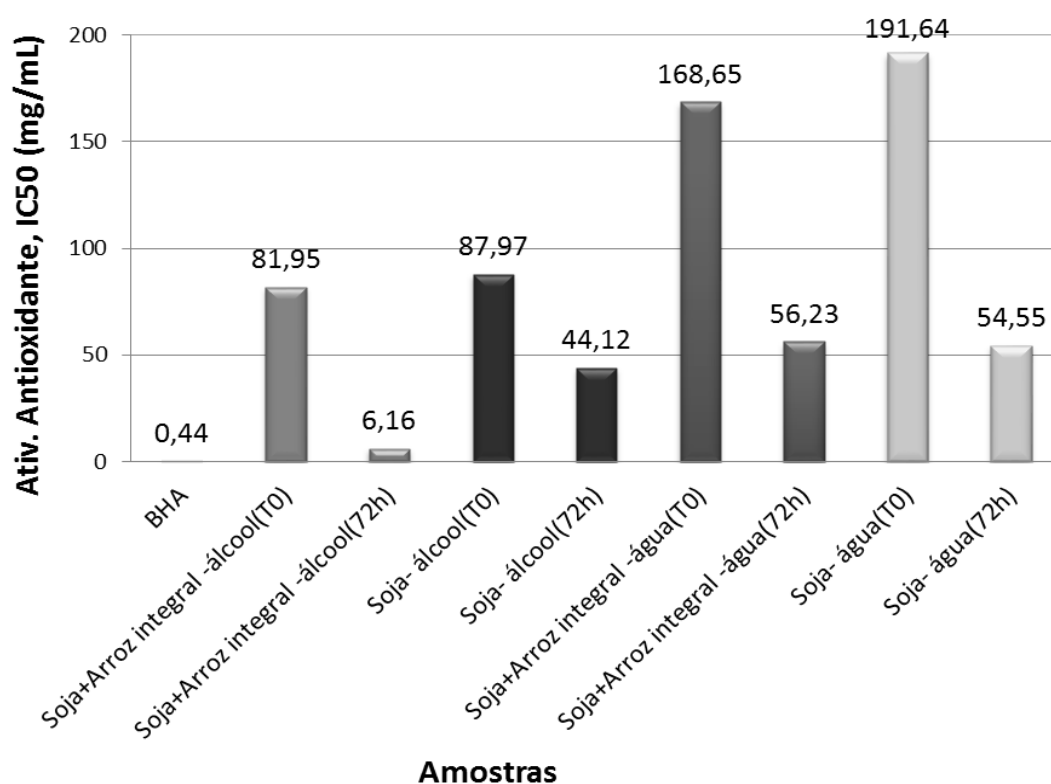
Para isso, buscou-se um método alternativo de análise para que fosse possível a detecção com maior precisão da atividade antioxidante mesmo em amostras mais concentradas, calculando-se a concentração de DPPH que as substâncias reduzem ao invés de expressar os resultados em % de atividade antioxidante.

Assim, conforme mostrado na figura 21 o substrato misto soja + arroz integral apresentou maior produção antioxidante (IC_{50} 6,16 mg/mL) quando comparada às FES conduzidas somente com soja como substrato (IC_{50} 44,125 mg/mL). As duas extrações feitas com etanol P.A. a 70% v/v, já com água ultrapura não apresentaram os mesmos resultados Soja + arroz integral (IC_{50} 56,234mg/mL) e soja (IC_{50} 54,554mg/mL).

CHANG (2008) realizou fermentações de soja com *Rhizopus* para a produção de *tempeh*, encontrando substâncias com ação antioxidantes na extração feita com etanol a 90%. Após 1 dia de fermentação encontrou IC_{50} 38,31mg/mL; 2 dias IC_{50} 21,11 mg/mL; 5dias IC_{50} : 13,07 mg/mL e 10 dias IC_{50} 18,83 mg/mL e para a extração com água os fermentados de 1 dia IC_{50} 20,01 mg/mL; 2dias IC_{50} : 49,84 mg/mL; 5 dias IC_{50} 28,76 mg/mL e 10 dias IC_{50} 9,70 mg/mL. Na presente pesquisa foi avaliada a atividade antioxidante de soja e a mistura dos substratos soja + arroz integral fermentados por *Rhizopus LPB-R.05* e a condição que melhor produziu substâncias com ação antioxidante foi com a mistura de substratos soja + arroz integral extraído com etanol P.A. a 70% v/v, equivalente a IC_{50} 6,61 mg/mL em 72 h de fermentação. Esta condição apresentou produção um pouco melhor que os resultados obtidos por CHANG (2008) em fermentação para a produção de *tempeh*. Já a partir dos extratos

aquosos foi encontrado IC_{50} 47,04 mg/mL em 72 h e aos 2 dias de fermentação CHANG (2008) encontrou IC_{50} 49,84 mg/ml, e aos 5 dias encontrou IC_{50} 28,76 mg/mL. ZHANG, *et al* (2012) encontrou IC_{50} 0,06mg/mL fermentando em trigo com *cordyceps militaris*, resultado bem superior ao encontrado neste estudo.

Figura 22. Resultados da atividade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso dos fermentado de soja e soja mais arroz integral, das amostras (0h) e fermentadas (72h) comparadas com o padrão de BHA:



A figura 22 representa os dados comparativos de atividade antioxidante em IC_{50} analisada pelo método de DPPH, de BHA com os extratos aquosos e alcoólicos das amostra fermentadas de soja e mistura de soja com arroz integral, no seu tempo inicial e depois de 72 horas de fermentação, mostrando o IC_{50} do

BHA, IC₅₀ 0,44mg/mL, enquanto que o melhor resultado deste trabalho foi obtido para o extrato alcoólico de fermentado de soja mais arroz integral (IC₅₀ 6,16mg/mL).

Ainda podemos verificar que com a fermentação ocorreu um atividade antioxidante bem superior a que foi obtido no seu tempo inicial da fermentação. Podendo concluir que o fungo *Rhizopus* aumenta a produtividade de antioxidante do que o encontrado somente em substratos como a soja e o arroz

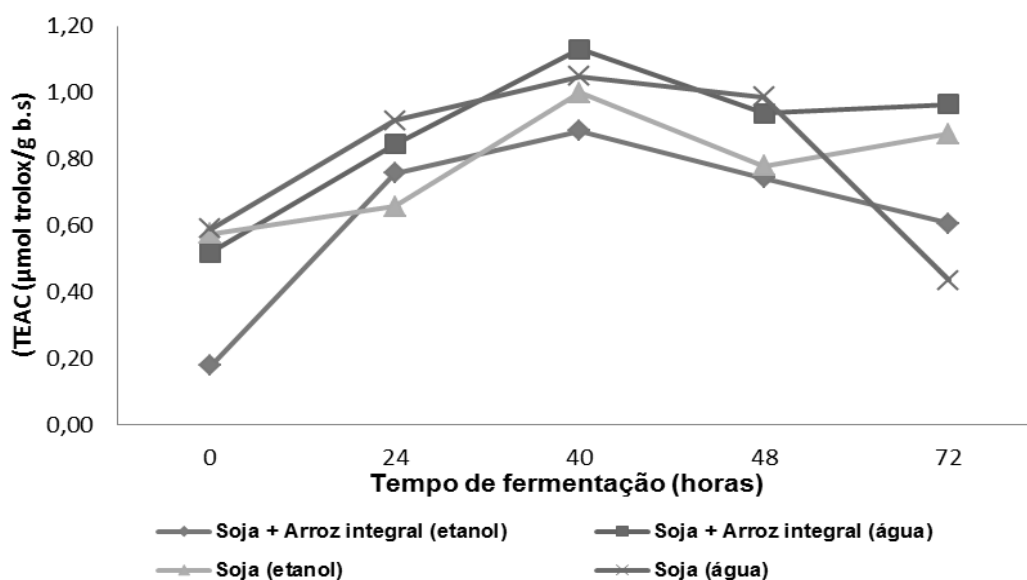
5.3.2. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS

A figura 23 abaixo apresenta os resultados de atividade antioxidante avaliada pelo método de ABTS ao longo do tempo de fermentação. O valor de TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) expressa de maneira quantitativa a atividade antioxidante de substâncias, em relação a um antioxidante padrão, denominado Trolox. Este ensaio avalia a capacidade antioxidante dos compostos presentes no substrato original, ou do produto da biotransformação destes, mais o potencial da capacidade antioxidante, das substâncias geradas ao longo da fermentação. Isto significa que o ensaio TEAC não reflete necessariamente o efeito antioxidante de uma única estrutura. De maneira geral, observou-se que a atividade antioxidante até 40 h de fermentação, e depois apresenta uma diminuição da atividade antioxidante. Ainda podemos observar que as amostras extraídas com água ultrapura vem apresentando melhores resultados do que os resultados das análises das amostras extraídas com etanol.

A atividade antioxidante analisada pelo método de ABTS teve melhor resultado com extratos preparados com água ultrapura, nas duas amostras de soja e soja mais o arroz integral fermentados com *Rhizopus LPB-R.05*, o que difere nos resultados obtidos com análises realizadas pelo método do DPPH, que os melhores resultados foram obtidos com extratos alcoólicos.

Figura 23. Atividade antioxidante expressa em TEAC ($\mu\text{mol trolox/gbs}$) obtida pelo método de ABTS das amostras fermentadas com soja e fermentadas com soja e arroz por *Rhizopus* LPB-R.05

O gráfico da Figura 23 apresenta a comparação entre as amostras fermentadas extraídas com etanol P.A a 70% v/v e amostras extraídas com água ultrapura. No tempo de fermentação de 40 h foi alcançado os maiores níveis de



produção de substâncias antioxidantes. Após as 40 h a atividade antioxidante diminui, indicando que o tempo ideal de fermentação para a máxima produção de substâncias antioxidantes é de 40 h. Os resultados ainda indicam a FES conduzida com a mistura dos substratos soja e arroz integral apresentou maior produção dessas substâncias.

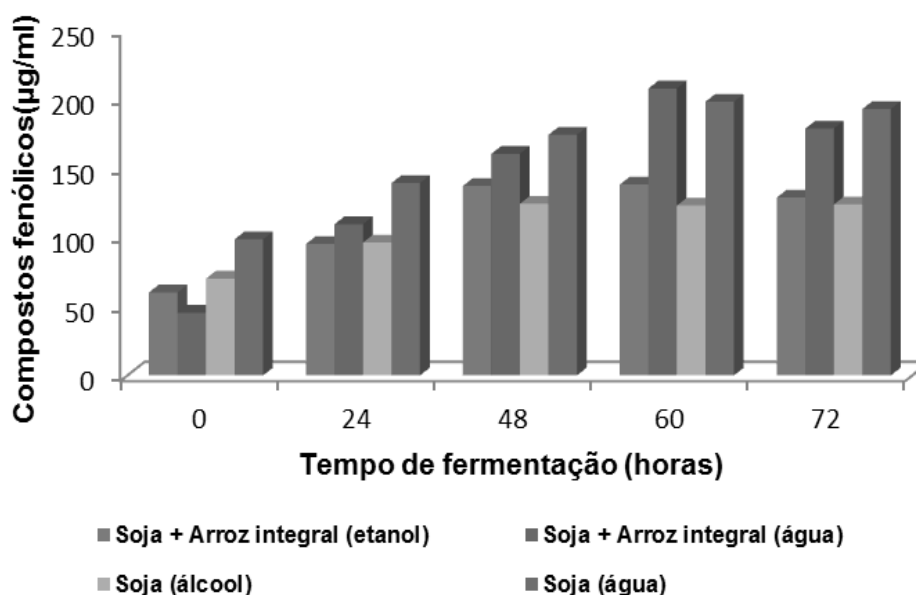
CHAIYASUT *et al.* (2010) reportaram fermentados de soja por *Aspergillus oryzae*, e os resultados das análises antioxidantes pelo método de ABTS resultaram em 1,25 $\mu\text{g/g}$ em 48 h de fermentação. Já nos resultados apresentados nessa dissertação foram alcançados 0,78 e 0,99 $\mu\text{mol/gbs}$ em soja fermentada no tempo de 48 horas de fermentação, enquanto que em soja mais o arroz integral foi encontrado 0,74 e 0,94 $\mu\text{mol/gbs}$ (etanol e água, respectivamente) em 48 h de fermentação. Embora o tempo de fermentação que apresentou melhor produção nestes testes foi de 40 h, com resultados de 0,99 e 1,04 $\mu\text{mol/gbs}$ (247,78 $\mu\text{g/g}$ e 260,30 $\mu\text{g/g}$) (etanol e água, respectivamente) em soja fermentada e 0,88 e 1,13

$\mu\text{mol/gbs}$ (220,25 $\mu\text{g/g}$ e 282,82 $\mu\text{g/g}$) (etanol e água) em soja mais o arroz integral fermentado são extraídos com álcool e água. Os melhores resultados foram obtidos utilizando os extratos aquosos.

5.3.3. Determinação de Compostos Fenólicos

O gráfico da Figura 24 apresenta os resultados de concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) nos extratos aquosos e alcóolicos ao longo dos tempos de fermentação (horas), de amostras de soja e de soja + arroz integral fermentadas com a cepa de *Rhizopus LPB-R.05*.

Figura 24. Resultados de concentração de compostos fenólicos nos extratos alcóolicos e aquosos ao longo dos tempos de fermentação 0, 24, 48, 60 e 72 h de fermentação por *Rhizopus LPB-R.05* em mistura soja (S) + arroz integral (AI), e soja (S).



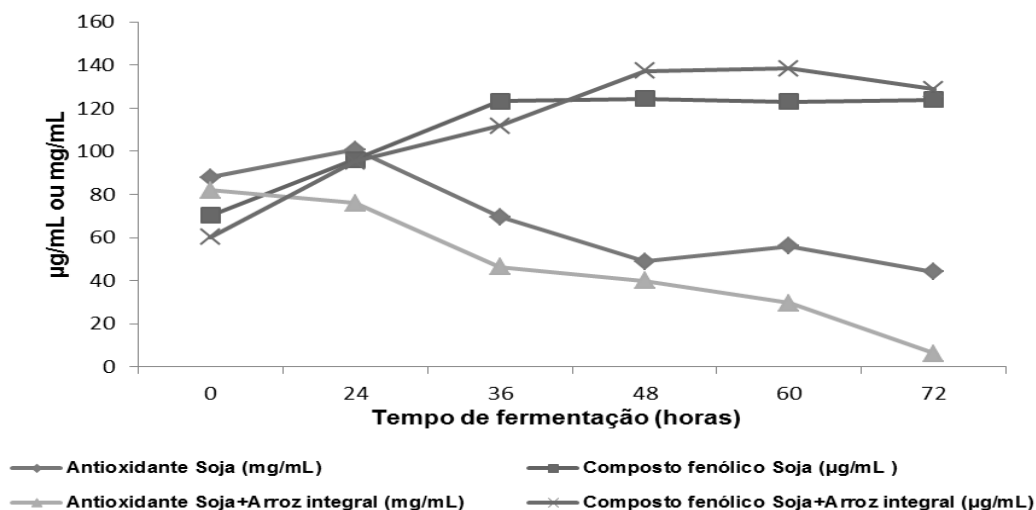
Tanto para as amostras fermentadas de soja como as de soja + arroz integral os extratos aquosos apresentaram melhores resultados quando comparados aos resultados obtidos com os extratos alcóolicos. Verificamos também que ao longo do tempo de fermentação a concentração de compostos fenólicos aumenta até 60 h de fermentação, com decréscimo das concentrações no tempo de fermentação de 72 h.

O aumento da concentração dos compostos fenólicos ocorreu até 60 h em soja com 144,21 mg/gbs. Já com soja + arroz integral verificou-se a presença de 211,18 mg/gbs na extração com álcool. As melhores concentrações de compostos fenólicos foram obtidas das amostras extraídas com água que atingiram os seguintes valores: soja com 235,35 mg/g.b.seca e soja + arroz integral 316,38 mg/gbs (melhor resultado deste estudo). KUMAR *et al.* (2010), encontraram concentrações de fenólicos em cultivares de soja de 0,8 a 5,4 mg/g de soja. CHAI *et al.* (2012), obtiveram em fermentados de soja 415 mg/100g a 1261 mg/100g de compostos fenólicos. Comparando com estes dados os resultados desta pesquisa apresentaram valores mais elevados de compostos fenólicos. Mesmo comparando os valores encontrados por KUMAR (2010) que obteve na soja 5,4 mg/g, na amostra em estudo, com a fermentação já havia 56 a 107mg/g. Então se compararmos os resultados obtidos nessa dissertação com os valores de compostos fenólicos na soja não fermentada reportados por KUMAR (2010), verifica-se que praticamente dobrou a concentração de compostos fenólicos nos fermentados de soja e soja com arroz integral.

Neste experimento os melhores resultados tanto de compostos fenólicos como para análise de antioxidante pelo método de ABTS foram alcançados nos extratos feita com água ultra-pura. Já nas análises da atividade antioxidante com DPPH, os melhores resultados foram obtidos nos extratos alcoólicos. Isto significa que os extratos alcoólicos e extratos aquosos são diferentes, ou seja, os solventes etanol e água ultra-pura extraíram compostos distintos das amostras sólidas.

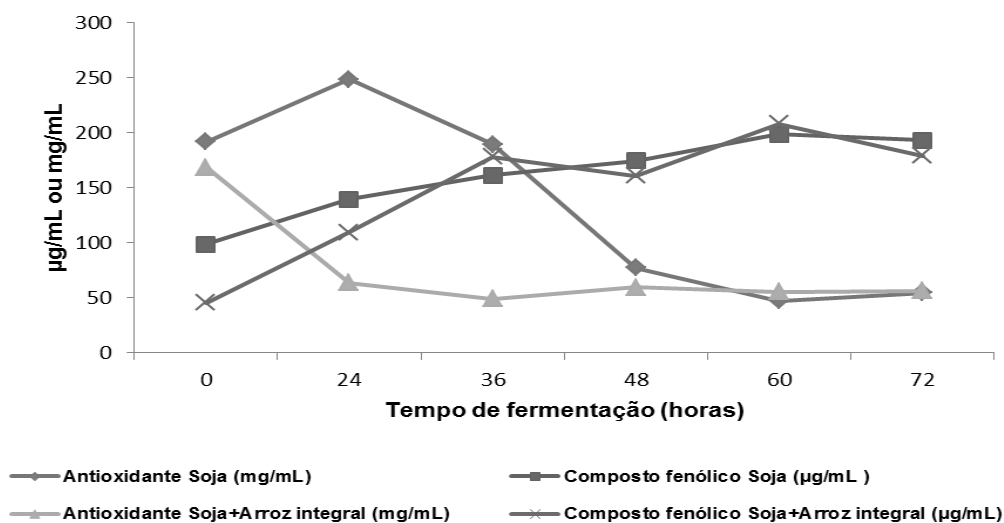
A figura 25 apresenta a comparação dos resultados de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e de quantificação de compostos fenólicos, nos extratos alcoólicos das amostras fermentadas.

Figura 25. Resultados de atividade antioxidante obtida pelo método de DPPH expresso em IC₅₀ e concentração de compostos fenólicos nos extratos alcoólicos das amostras de soja e mistura de soja + arroz fermentada com *Rhizopus* LPB-R.05



A figura 26 apresenta a comparação dos resultados de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e de quantificação de compostos fenólicos, nos extratos aquosos das amostras fermentadas.

Figura 26. Comparação dos resultados de atividade antioxidante pelo método de DPPH expresso em IC₅₀ e pelo método de compostos fenólicos. Amostras de soja e mistura de soja + arroz fermentada com *Rhizopus* LPB-R.05, extraídas com água ultrapura.

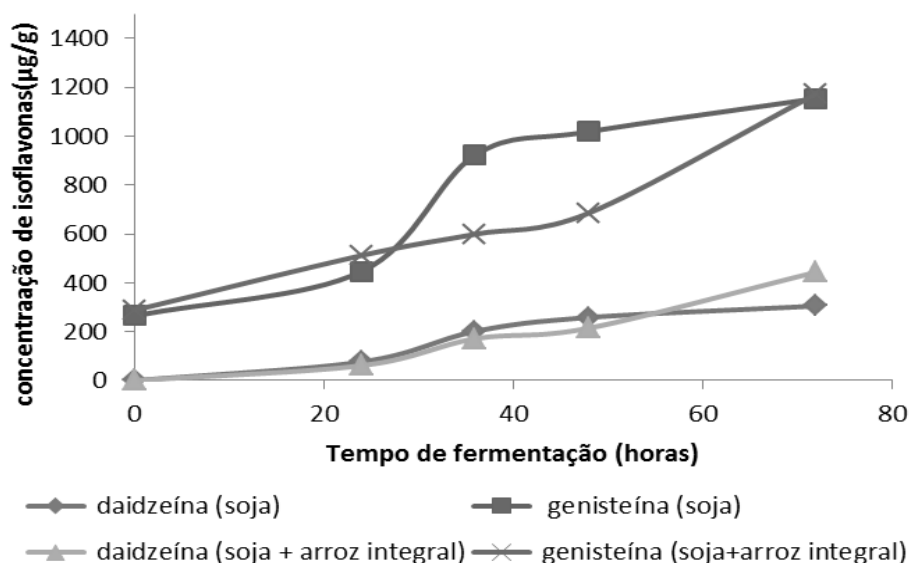


Nota-se nos gráficos que quanto maior a concentração dos compostos fenólicos, maior é a atividade antioxidante demonstrados pelo menor índice IC50 (mg/mL). A correlação é de 78,3% das amostras de soja fermentadas extraídas com solução alcoólica, enquanto uma melhor correlação foi observada (83,7%) nas amostras fermentadas (mistura de soja + arroz integral) também extraídas com solução alcóolica. E ainda as amostras de mistura de soja + arroz fermentadas por *Rhizopus* extraídas com água ultrapura apresentaram melhor recuperação das substâncias bioativas do que as extraídas com etanol 70%. As correlações observadas foram 78,9% para as amostras fermentadas em soja e 87,2% para as amostras fermentadas em mistura de soja + arroz integral.

5.3.4. Determinação da Concentração de Isoflavonas

A Figura 27 apresenta os resultados da produção de isoflavonas nos tempos de fermentação 0, 24, 36, 48 e 72 h de fermentação (FES) por *Rhizopus LPB-R.05* utilizando como substrato soja e mistura de substratos soja e arroz integral.

Figura 27. Produção de isoflavonas (µg/g de fermentado seco), durante as FES de soja e mistura de soja + arroz integral pela linhagem *Rhizopus LPB-R.05*



Comparando-se os valores obtidos no tempo inicial da fermentação (0 horas), é possível observar que a concentração de daidzeína e genisteína aumentou gradativamente até o final de 72 h de fermentação. A fermentação da soja biotransformou 305,11 µg/gbs de daidzeína e 1154,36 µg/gbs de genisteína, enquanto que a fermentação conduzida com substrato misto (soja e arroz integral) obteve melhores resultados, com produção de 444,00 µg/gbs de daidzeína e 1173,38 µg/gbs de genisteína, respectivamente. Esses resultados indicam que os substratos fermentados apresentaram maior concentração de isoflavonas que nas amostras não fermentadas com zero de daidzeína nos dois substratos e 264 e 287 µg/g de genisteína respectivamente na amostra da soja e soja + arroz integral fermentada.

GENOVESE e LAJOLO (2001), relatam que o melhor resultado de concentração de isoflavonas foi obtido com amostras extraídas com metanol grau HPLC a 80%. O teor total de isoflavonas encontrado em soja foi de 88 a 208 mg de aglicona/100g, enquanto que DEVI *et al* (2009), encontrou em soja teores de genisteína (393 mg/kg) e daidzeína (262 mg/kg) num total de 655 mg/kg. Mesmo que na soja não fermentada já existam isoflavonas conforme citados acima, os resultados desta análise demonstram que amostras de soja fermentada (FES) por *Rhizopus* após 72 h apresentaram um aumento na concentração de isoflavonas, 305 µg/gbs de daidzeína e 1154 µg/gbs de genisteína, respectivamente. Já os resultados obtidos na fermentação (FES) com substrato misto (soja+ arroz) alcançaram concentrações de 444 µg/gbs de daidzeína e 1173 µg/g de genisteína.

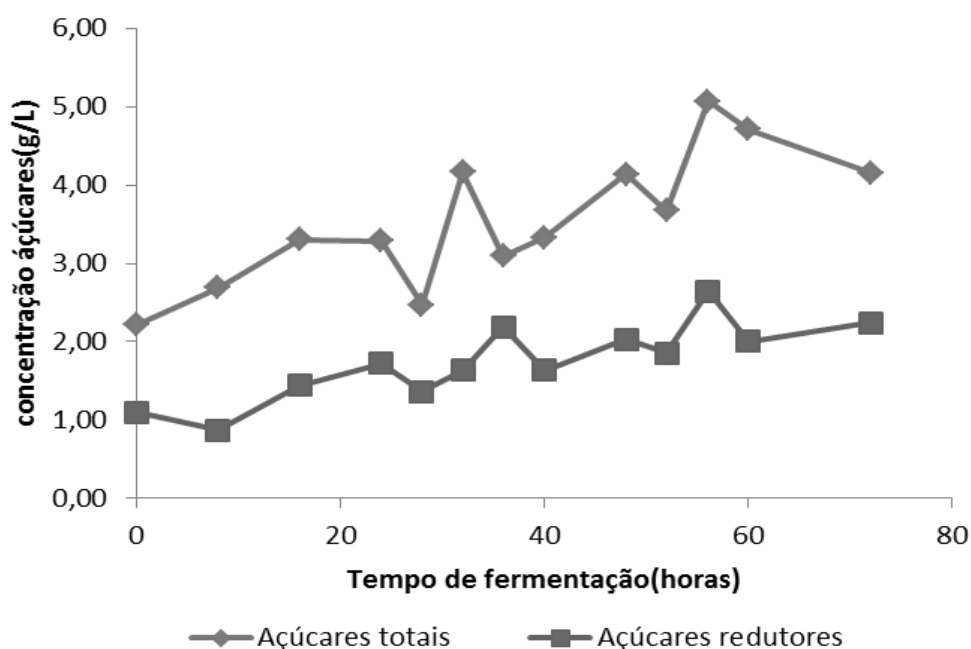
Segundo AGUIAR e PARK (2004) a fermentação de soja com *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, produziu isoflavonas: daidzeína (906,1 µg/g) e genisteína (392,2 µg/g). Nos resultados desta pesquisa, soja fermentada com *Rhizopus* LPB-R.05 produziu daidzeína na concentração de 305,11 µg/g e genisteína na concentração de 1154,36 µg/g. Já na mistura de soja + arroz integral a produção foi um pouco mais elevada: daidzeína (444,00 µg/gbs) e genisteína (1173,38 µg/gbs). Assim, em soja fermentada por *Rhizopus* LPB-R.05 houve aumento na produção de genisteína menor que na fermentação de soja com *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, onde a produção de daidzeína foi maior.

5.3.5. Determinação de Açúcares Totais e Redutores

A figura 28 apresenta a média dos resultados das análises de açúcares totais (g/L) e açúcares redutores (g/L) nas FES conduzidas com soja e nas FES conduzidas com mistura de soja e arroz integral por *Rhizopus LPB-R.05*.

Para esta análise foi feita extração aquosa dos açúcares presentes nas amostras. Foi utilizado 3g de amostra em 25 mL de água.

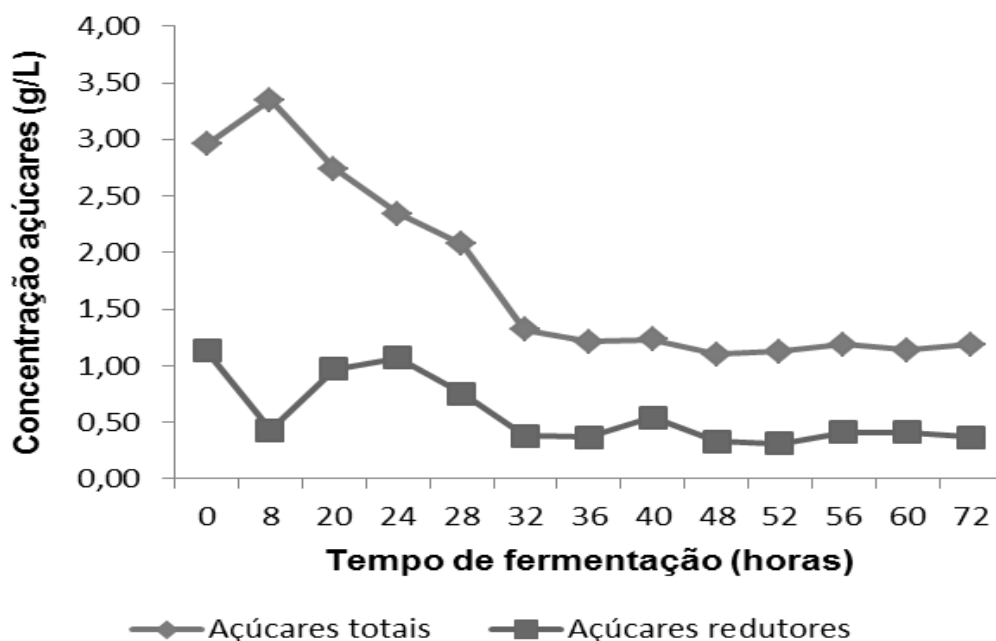
Figura 28. Média dos resultados das análises de açúcares totais (g/L) e açúcares redutores (g/L) nas FES conduzidas com mistura de soja + arroz integral por *Rhizopus LPB-R.05*.



Os açúcares totais da amostra do fermentado de soja com a mistura de arroz integral, deve ser devido pela presença de amido, teve um comportamento diferente com a amostra com fermentação somente de soja. Do gráfico da figura 28 nota-se que os resultados obtidos da FES com mistura de substratos (soja e arroz integral) apresentou oscilação nas concentrações de açúcares totais (g/L). Esse comportamento pode ser explicado pela necessidade do fungo hidrolisar carboidratos complexos, e liberar açúcares mais simples para consumir. Estes açúcares, são liberados durante hidrólise enzimática que possivelmente ocorre durante a fermentação em substratos complexos como é o caso desse estudo.

Devido a esta quebra dos açúcares complexos, pode ocorrer uma oscilação dos açúcares redutores, mesmo que os microrganismos estejam consumindo estes açúcares.

Figura 29. Comparação dos resultados das concentrações de açúcares totais e açúcares redutores nas amostras fermentadas de soja por *Rhizopus LPB-R.05*



A figura 29 mostra o perfil dos açúcares redutores e totais ao longo da fermentação de soja pelo fungo *Rhizopus LPB-R.05* em FES.

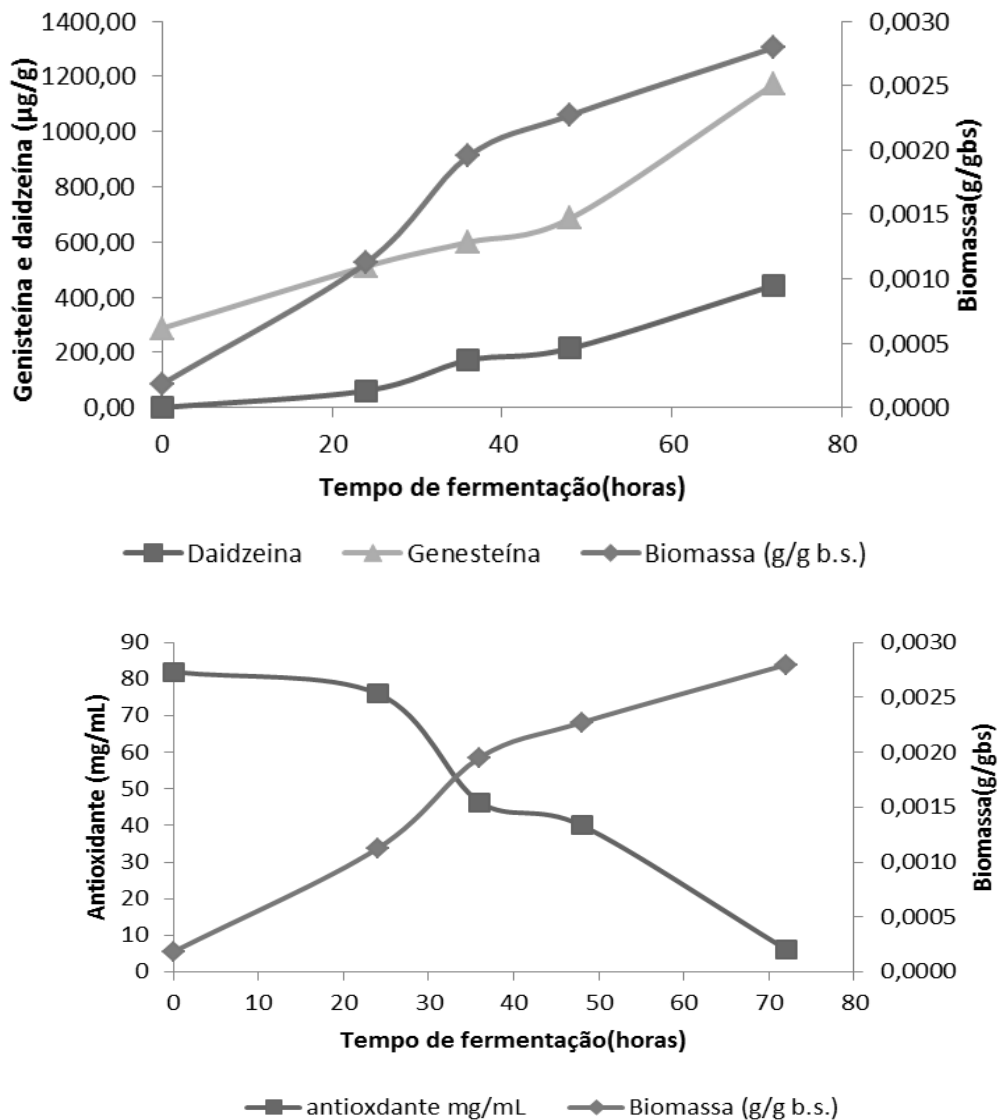
Soja é composta por oligossacarídeos, por isto no início da fermentação é alta a quantidade destes açúcares, que a medida que ocorre o crescimento do microrganismo, os açúcares totais são hidrolisados em açúcares menos complexos, para seu consumo. Durante o metabolismo de crescimento o fungo apresentou maior consumo destes açúcares, o que sinaliza que os microrganismos necessitam destes açúcares para a produção de biomassa. Isto gera uma oscilação na quantidade de açúcares durante a fermentação, e quando diminui o seu crescimento, a quantidade de açúcares se mantém mais estável.

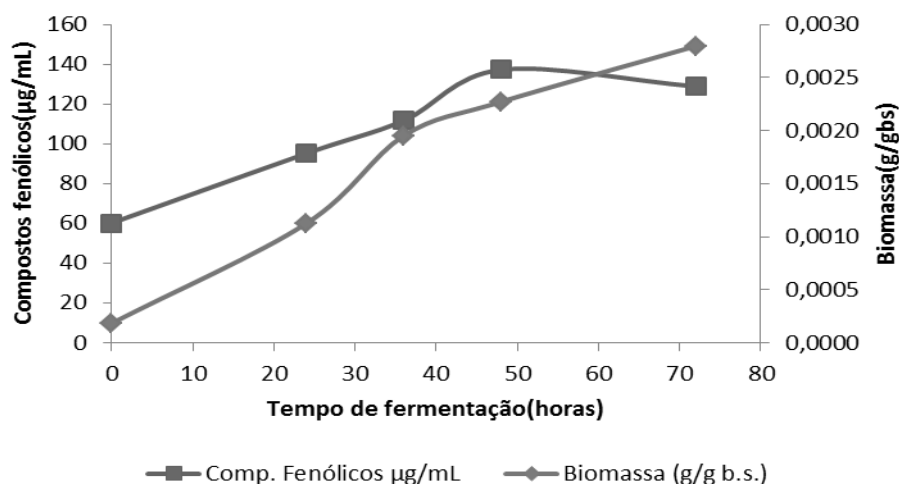
Segundo NASAR *et al.* (2008), foi encontrado em soja fermentada com *Rhizopus LPB-R.05*, 2,21% de açúcar redutor e 61,23% de açúcares totais com fermentação de 48h a 37°C.

5.3.6. Determinação de Biomassa (Ergosterol)

Os resultados de formação de biomassa (expressos como g de micélio por g de amostra fermentada na base seca) ao longo do tempo de fermentação estão apresentados nos gráfico da Figura30. A figura mostra a evolução da formação de biomassa de *Rhizopus LPB-R.05* durante a FES de mistura de soja + arroz.

Figura 30. Aumento da formação de biomassa (g ergosterol/gbs) do fungo *Rhizopus* LPB-R.05 em FES utilizando a mistura de substratos soja + arroz integral, comparadas ao produção de isflavonas, antioxidante e compostos fenólicos

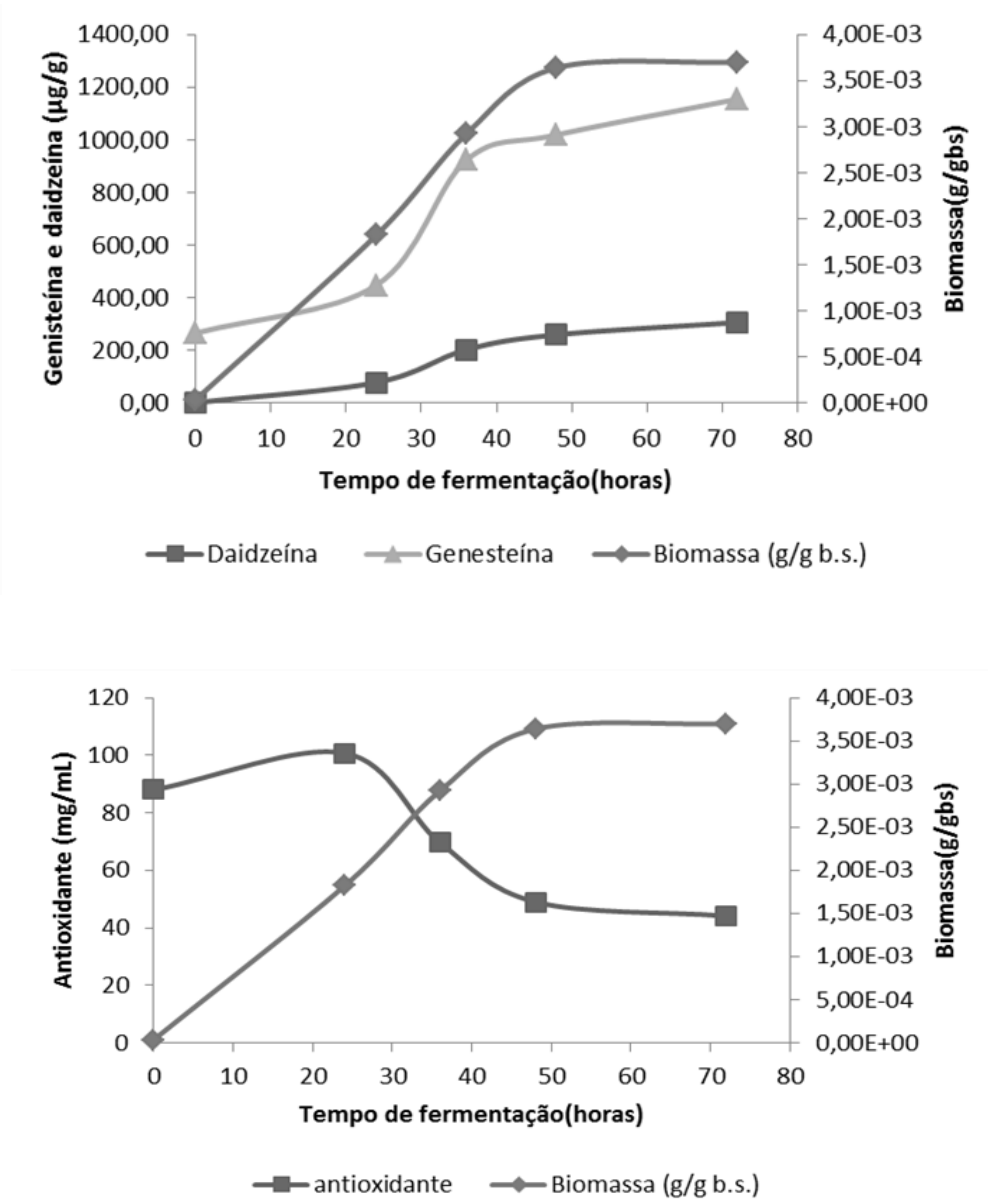


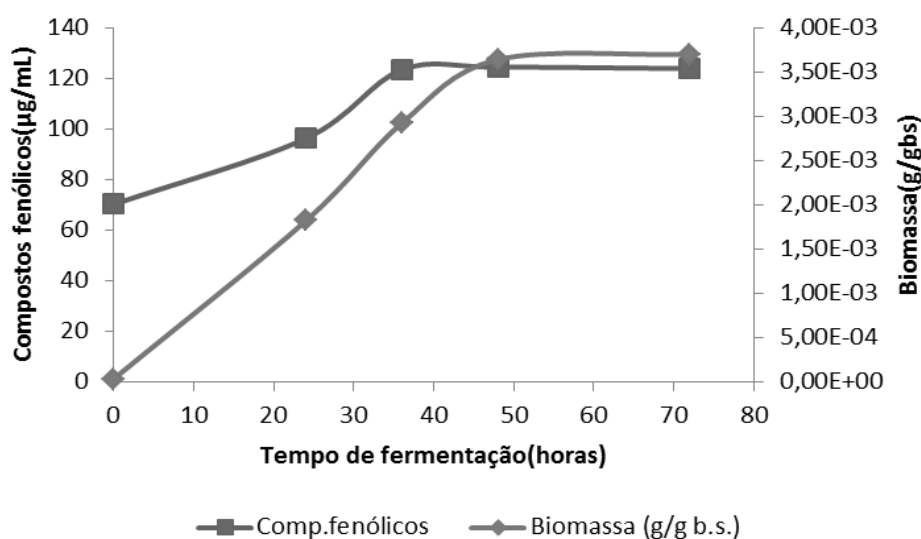


O resultado do tempo (0 h) mostra a concentração de ergosterol do substrato úmido inoculado com esporos de *Rhizopus LPB-R.05* de 0,18 mg de ergosterol por grama de fermentado na base seca. Como não foram realizadas análises nas amostras fermentadas dentro das primeiras horas, não foi possível determinar a fase de adaptação (fase *lag*) do fungo ao substrato. O pico de biomassa formada foi observado em 60 h de fermentação (3,95 mg ergosterol/g fermentado b.s.). A figura. acima ainda mostra a comparação do aumento da biomassa em correlação com o aumento da produtividade de isoflavonas, antioxidantes e compostos fenólicos que ao decorrer do tempo de fermentação vão aumentando a produção destas substâncias. Mais experimentos devem ser realizados para confirmar se a fase estacionária e declínio que ocorre nos tempos superiores a 60 h, já que foi observado uma concentração inferior em 72 h de fermentação.

A Figura 31 apresenta o aumento da biomassa (g de micélio por grama de fermentado na base seca) pelo fungo *Rhizopus LPB-R.05* durante a fermentação no estado sólido (FES) em substrato grãos de soja.

Figura 31. Evolução da formação de biomassa (g/gbs) de *Rhizopus* LPB-R.05 durante a FES de soja comparadas ao produção de isoflavonas, antioxidante e compostos fenólicos





A Figura 31 mostra que a fase de adaptação (fase lag) pode ser observada nas primeiras 8 h de fermentação, pois praticamente não houve aumento na concentração de biomassa. A partir de 8 h de fermentação já é possível observar um expressivo aumento na concentração de biomassa aos 40 h de fermentação, e após 48-60 h ocorre uma fase estacionária. Mais análises poderiam confirmar as diferentes fases do crescimento fúngico em fermentação de soja. Porém como o objetivo deste trabalho era a produção e a quantificação dos compostos antioxidantes, o tempo de fermentação foi interrompido após o pico máximo de antioxidantes produzidos pelo fungo, tanto na fermentação de soja (Figura 30) como na fermentação de soja + arroz (Figura 27).

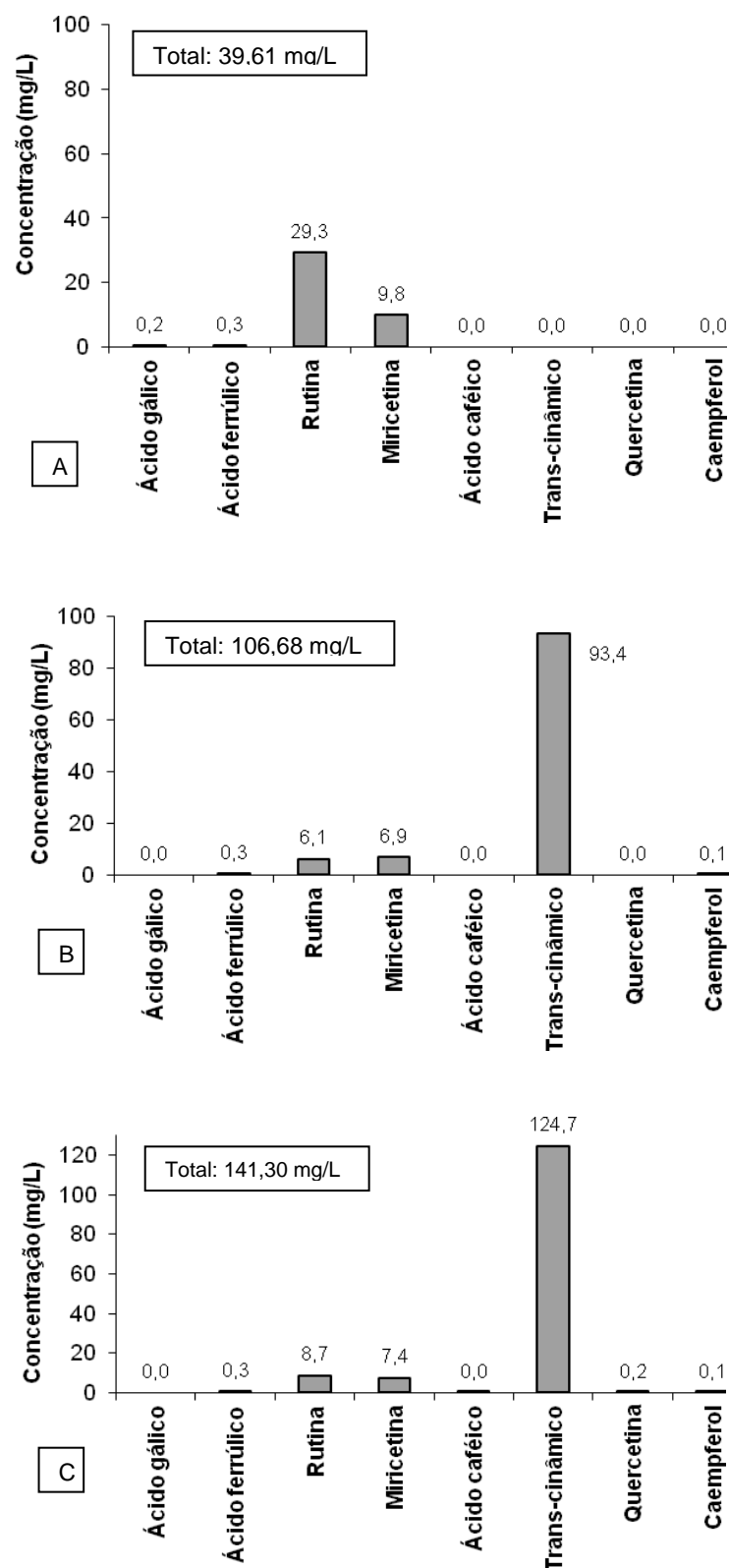
FENG *et al.* (2007) encontrou em fermentado com *Rhizopus oligosporus* J401 57,5 µg/g de biomassa em matéria seca de fermentado com cevada. NOUT *et al.* (1987), descreveram que o teor de ergosterol em soja fermentada era na ordem de 60-90 µg/mg de biomassa seca, dependendo da composição do substrato, mas nos experimentos encontraram 3230 µg/g de *tempeh* seco. Nesta pesquisa foi encontrado para substrato com soja o valor de 0,0045 g/g (g de ergosterol por grama de fermentado seca) em 72 h de fermentação e em fermentado de soja com arroz integral foi encontrado 0,0028g/g em 72 h de fermentação. Transformando-se as unidades em µg/g foram encontradas 4500 µg/g e 2800 µg/g de ergosterol, respectivamente, próximo do valor encontrado por NOUT *et al.*(1987).

5.3.7. Identificação e Quantificação dos Compostos Antioxidantes

Compostos fenólicos e flavonoides e respectivas concentrações (mg/L) foram feitos em análise de fermentados de grãos de soja (orgânica) por *Rhizopus LPB-R.05* em extratos etanólicos P.A (1:10 m/v), estes analisados em cromatografia HPLC .

Na figura 32 está representada a identificação e quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides e respectivas concentrações (mg/L) em fermentado de grãos de soja por *Rhizopus LPB-R.05*. Sendo (A) 0 h; (B) 40 h e (C) 72 h de fermentação. A seguir estão os padrões utilizados com os tempos de retenção: 18-ácido gálico; 32-ácido caféico; 40-ácido ferrúlico; 45-Rutina; 49- Miricetina; 54- trans-cinâmico; 60- Caempferol.

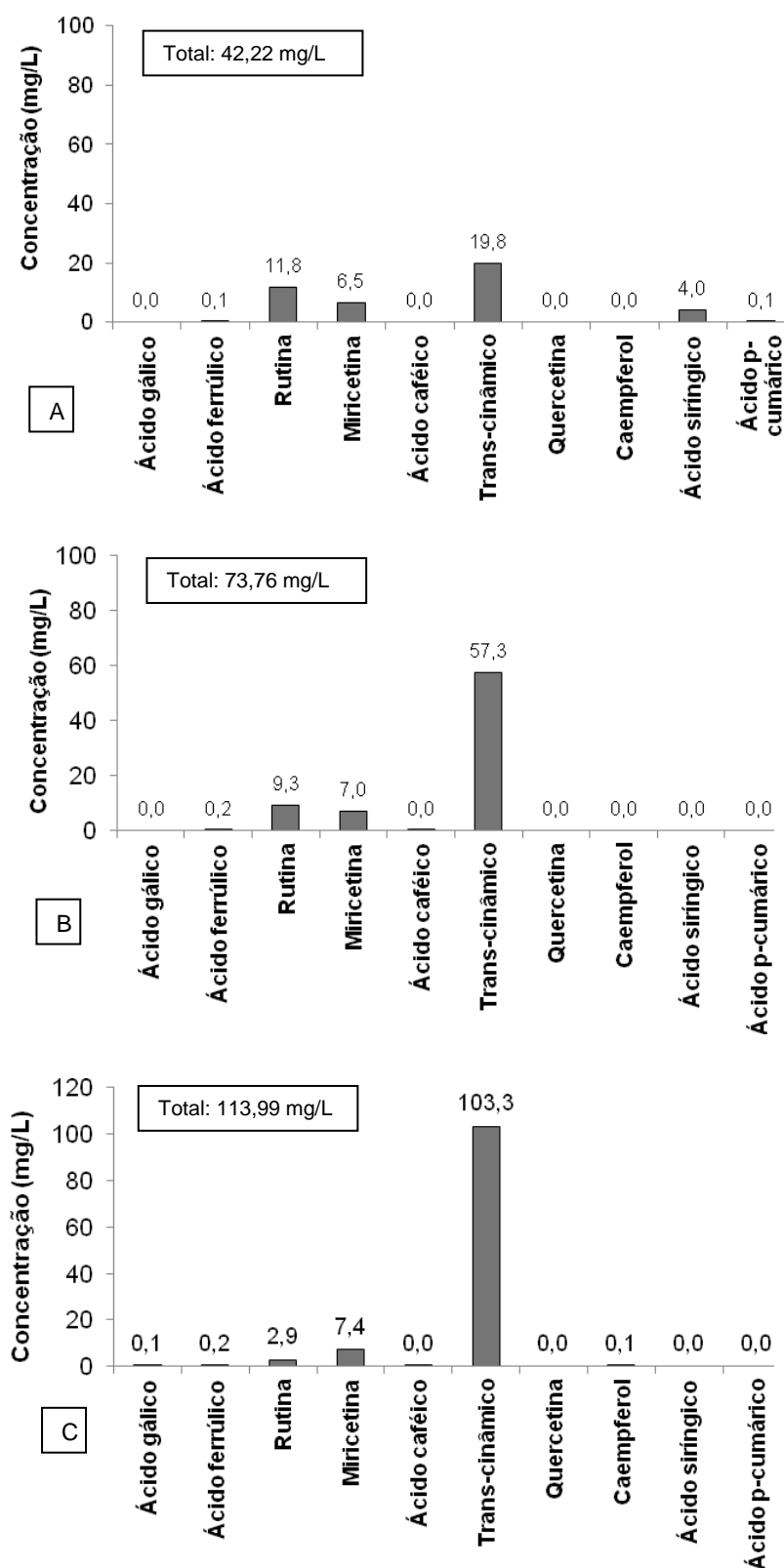
Figura 32. Quantificação e identificação por HPLC dos compostos fenólicos e flavonóides e respectivas concentrações (mg/L) em extrato etanólico de fermentado de grãos de soja por *Rhizopus LPB-R.05*. (A) 0 h; (B) 40 h e (C) 72 h de fermentação.



Observando os resultados das identificações e concentrações de compostos fenólicos na Figura 32, após 72 h de fermentação a concentração total dos compostos antioxidantes aumentou de 39,61 mg/L para 141,30 mg/L com aumento na concentração de 356%. A produção de trans-cinâmico durante o processo fermentativo foi evidenciado na fermentação de soja aumentando em 124,7 vezes a produção após 72 h de fermentação por *Rhizopus LPB-R.05*.

Há pesquisas de compostos fenólicos e flavonóides, como a reportada por ZHANG *et al.* (2012), que utilizaram trigo como substrato de FES com *Cordyceps militaris*, e observaram um aumento da concentração dos compostos fenólicos durante a fermentação e identificaram (ácido ferrulíco, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cafeíco), e HIROTA *et al.* (2000), que quantificou alguns dos compostos polifenóis como; p-cumárico 300µM, ácido ferúlico 59 µM, ácido siríngico 20µM, e ácido vanílico 65µM de fermentados de soja, misô, diferentes polifenóis foram encontrados nesta pesquisa. Foram observados o aumento maior de ácido trans-cinâmico durante a fermentação, e outros como ácido gálico, ácido ferúlico, quercetina e caempferol, que apresentaram produções insignificantes. Além desses, a concentração de rutina e miricetina foram reduzidas ao longo de 72 h de fermentação.

Figura 33. Quantificação e identificação por HPLC dos compostos fenólicos e flavonóides e respectivas concentrações (mg/L) em extrato etanólico de fermentado de grãos de soja e arroz integral por *Rhizopus LPB-R.05*. (A) 0 h; (B) 40 h e (C) 72 h de fermentação.



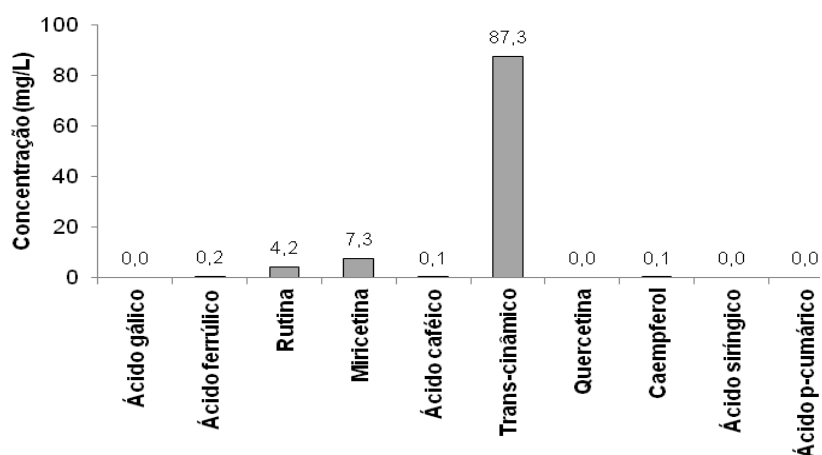
Observou-se aumento de 357% na produção de compostos polifenóis (fenólicos + flavonóides) nas FES conduzidas apenas com soja por *Rhizopus LPB-R.05* (Figura 32).

Evidenciou-se um aumento de 269% na produção de compostos polifenóis fenólicos totais após 72 h de fermentação em grãos de soja + arroz integral por *Rhizopus LPB-R.05* (Figura 33).

O processo de fermentação com grãos de soja e grãos de soja + arroz integral mostraram que houve maior produção do composto fenólico identificado como trans-cinâmico com aumento de 5,22 vezes e durante o tempo de fermentação.

Na figura 34 está representada os resultados da identificação e concentração dos compostos polifenóis (fenólicos + flavonoides) na amostra fermentada por *Rhizopus LPB-R.06* em soja + arroz integral.

Figura 34. Resultados da identificação e concentração dos compostos polifenóis (fenólicos + flavonoides) na amostra do extrato etanólico do fermentado por *Rhizopus LPB-R.06* em soja + arroz integral em 72h de fermentação.



Observa-se que nos mesmos substratos utilizados para a fermentação (grãos de soja + arroz integral) e no mesmo tempo de fermentação (72 h) a linhagem *Rhizopus LPB-R.06* não apresentou a mesma capacidade de produção de substâncias antioxidantes como foi observado na fermentação pela linhagem *Rhizopus LPB-R.05*. A principal substância antioxidante produzida por *Rhizopus LPB-R.06* também foi o trans-cinâmico, porém com concentração inferior (87,3 mg/L) quando comparada a produção de trans-cinâmico por *Rhizopus LPB-R.05* (103,3 mg/L).

Dentre os resultados apresentados nas Figuras 32 e 33, observou-se que a fermentação apenas com soja resultaram nos melhores resultados de polifenóis totais (flavonoides + fenólicos) por *Rhizopus LPB-R.05* (conforme cromatogramas apresentados no item Apêndice 3), que consideram apenas 13 compostos conforme os padrões injetados previamente. Não foram encontrados dados na literatura sobre a produção desses compostos por fungos em FES ou FSm para a comparação dos resultados apresentados nas Figuras 32, 33 e 34.

6. CONCLUSÕES

- O estudo da extração sólido-líquido mostrou que a proporção de 3 g de amostra fermentada em 25 mL de solução etanólica ou água sob agitação à 120 rpm por 1 h foi a melhor condição para a recuperação dos compostos bioativos com capacidade antioxidante produzidos por FES;
- Dentre as 17 linhagens de *Rhizopus* spp. testadas, a linhagem de *Rhizopus* LPB-R.05 apresentou maior capacidade de produção de compostos bioativos com capacidade antioxidante em FES;
- Dos grãos de cereais e outros substratos testados, grãos de soja e arroz integral foram selecionados como ideais para a FES por *Rhizopus* sp. para a produção de compostos com ação antioxidante;
- As cinco maiores produtoras de fitases, que degradam o fator antinutricional (ácido fítico e seus sais: fitatos) presentes na soja são: *Rhizopus* LPB-R.14 (52,7 U/gbs), *Rhizopus* LPB-R.06 (49,7 U/gbs), *Rhizopus* LPB-R.08 (47,2 U/gbs), *Rhizopus* LPB-R.02 (46,4 U/gbs) e *Rhizopus* LPB-R.07 (45,1 U/gbs) em 72 h do processo de FES;
- A maior produção de proteases foi alcançada pela linhagem *Rhizopus* LPB-R.07 (20,1 U/gbs) seguida de *Rhizopus* LPB-R.05 (18,2 U/gbs) e por *Rhizopus* LPB-R.02 (15,0 U/gbs) em 72 h do processo de FES;
- As FES conduzidas com grãos de soja e mistura de grãos de soja e arroz integral apresentaram melhores resultados de produção de compostos bioativos com capacidade antioxidante;
- A concentração inibitória de antioxidante (IC₅₀, em mg/mL) das amostras fermentadas apresentou correlação com a produção de compostos fenólicos, pois quanto menor o IC₅₀, maior foi a concentração de compostos bioativos com ação antioxidante (método DPPH);
- A produção dos compostos polifenóis totais identificados por HPLC de FES com soja apresentou aumento de 357% após 72 h e fermentação da mistura de soja + arroz integral apresentou aumento de 269% no mesmo tempo de fermentação por *Rhizopus* LPB-R.05;

- Mais estudos precisam ser realizados para avaliar outros compostos produzidos por FES pela linhagem selecionada *Rhizopus LPB-R.05* para então verificar quais dos substratos (soja) ou (soja + arroz) permitem maiores produções desses compostos
- Na fermentação de soja com arroz integral com *Rhizopus LPB-R.05*, foi verificado um aumento de 408% na concentração de genisteína e aumento de 444% na concentração de daidzeína;
- Na fermentação de soja com *Rhizopus LPB-R.05* foi verificado um aumento de 436% na concentração de genisteína e aumento de 305% na concentração de daidzeína

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar ajuste da metodologia de quantificação ou detecção das substâncias produzidas;
- Estudar a estabilidade das substâncias antioxidantes durante o armazenamento à temperatura ambiente, temperatura de refrigeração 4°C, à temperatura de congelamento -18°C;
- Concentrar e purificar as substâncias antioxidantes produzidas; Realizar mais testes para melhorar a produtividade de antioxidante e seus compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; PARK, Y. K. Conversão de daidzina e genistina de soja por glicosidade de *Aspergillus oryzae*, Boletim Ceppa, v.22, p.185-195. 2004.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. v. 48, n.4, p. 487–491, 2001.
- AL QASIM TRUST. Classification Of Fungi Part 1 (F.Sc-Biology-Chapter 8). Disponível em: < <http://www.desktopclass.com/education/fafsc/classification-of-fungi-part-1-f-sc-biology-chapter-8.html> >. Acesso em: 20/02/2012.
- ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acids, saponin, and isoflavones related to soybean processing. J. Nutrition, n.125, p. 24-31, 1995.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais, técnicas de extração. Boletim do Ceppa, Curitiba, v. 24, p 323-325, 2006.
- ANON, M.C. Tempeh: protein-rich food may increase disease resistance. Agricultural Research, Washington, v.17, p.5, 1969.
- ANVISA. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jan. 2012.
- AOKI, H.; Uda, I.; Miyamoto, N.; Tagami,K.; Furuya, Y.; Mankura, M.,, 161910, fermented foods rich in gamma-aminotated soybean foods rich in aminobutyric acid and free aminoacids produced by fermentation of soybean using Tempeh molds, 2003
- ARNAUD, M.; FARR, D.R. Patente 3917851. Fermented soya protein, 1975.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998

ASTUTI, M.; MELIALA, A.; DALAIS, F. S.; WAHLQVIST, M. L. Tempeh, a nutritious and healthy food from Indonesia. Asia Pacific. Journal of Clinical Nutrition, v. 9, p. 322-325, 2000,

BABU,P.D.; BHAKYARAJ,R.; VIDHYALASHMI, R.A. Low Cost Nutritious Food - Tempeh - a review. World Journal of Dairy&Food Science, 2009.

BAJAJ, Y.P.S. Medicinal and aromatic plants. Biotechnology in agriculture and forestry. v. 24. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

BAUMANN, U.; BISPING, B.; REHM, H.J. Content and release of amino acids during the tempeh fermentation. *In*: HERMANA, Mien; MAHMUD, K.M.S.; KARYADI, D. (Eds.). Second Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation, Jakarta, Indonesia. Ministry of Health, Nutrition Research and Development Centre, Bogor, Indonesia, p. 33–47 e 13–15, feb./1990.

BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSEDRE, P.L.; CABANIS, J.C. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. Bulletin L'O.I.V., p. 43-67, 1C, 2010.

BERG,S.; OLSSON,J.; SWAMBERG,M.; SCHNURER,J.; ERIKSSON,A., Patente 7074441 method for the production of fermented whole grain baley with *rhizopus*,and products thereof, 2006.

BHATHENA, S.J. ; VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, American Journal Clinical Nutrition, n. 76, p. 1191-1201, 2002.

BHAVSAR, K.; RAVI KUMAR V.; KHIRE J. M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. DOI: 10.1007/s10295-010-0926-z, 2010.

BISPING, B.; HERING, L.; BAUMANN, U.; DENTER, J.; KEUTH, S.; REHM, H.J.(1993) Tempe fermentation: some aspects of formation of δ -linolenic acid, proteases, and vitamins. *Biotech Advances*, n. 11, p. 481–493, 1993.

BLASA, M.; GENNARI, L.; ANGELINO, D.; NINFALI, P. Fruit and Vegetable Antioxidants in Health. *In*: WATSON, T.R.; PREEDY, V.R. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. USA: Elsevier, 737 p.

BLAKEBROUGH, N., *Biochemical and biological engineering Science*, Academia Press, Nova York. 1987.

BORZANI, W., AQUARONE, E., SCHEINIDELL, W., LIMA, U.A., *Biotecnologia industrial*. v.IV, *Biotecnologia na produção de alimentos*, p.465-489, 2001.

BRANDÃO, A. S. P.; REZENDE, G. C; MARQUES, R.W.C. Crescimento agrícola no período 1999/2004: a explosão da soja e da pecuária bovina e seu impacto sobre o meio ambiente. *Economia Aplicada*, v. 10, n. 2, p. 249-266, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, London, v.28, n.1, p. 25-30, 1994.

BRASIL.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Presidência da República. CONAB - Lei Nº 10.831, 23/12/2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica, Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 21/05/2012.(2011)

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento de grãos 2010/2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 06 jan. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CONAB- Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde(2011)

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E., Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines, J. Agric. Food Chem., 49 (10), pp 4841–4844, 2001.

BROUNS, F.(2002) Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. Food Research International, v. 35, n. 2-3, p. 187-194.

BRUM, L. P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (Ácido ferulico e transinâmico e dos flavonóides (quercetina e Kaempherol) sobre os herpes vírus bovinos 5 e vírus da cinomose canina, Viçosa, Tese (Pós graduação em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, (2006).

CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. Nutricional Cancer, v. 25, p.1-7, 1996.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KITAMURA, K.; BELÉIA, A.D.P.; OLIVEIRA, M.C.N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. Breeding Science, Tokyo, v.48, p.409-413, 1998.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLAT, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracica, SP: Fealq, 2005, p. 81-124.

CHAIYASUT, C.; KUMAR,T; TIPDUANGTA,P.; RUNGSEEVIJITPRAPA,W. (2010), Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. African journal of Biotechnology. v. 9, n. 26, p. 4120-4126, 2010.

CHANG, C.T.; HSU,C.K.; CHOU,S.T.; CHEN,Y.C.;HUANG,F.S.; CHUNG,Y.C.(2008), Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. Internacional Journal of Food Science & Technology. n. 44, p. 799–806, 2008.

CHANG, Y. N.; HUANG, J.C.; LEE, C.C.; SHIH, I.L.; TZENG, Y. M. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. Enzyme and Microbial Technology, n.30, p.889-894, 2002.

CHANTASARTRASAMEE, K.; AYUTHAYA, D. I.; INTARAREUGSORN, S.; DHARMSTHITI S, Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. Process Biochemistry, v. 40, n. 7, p. 2285-2289, 2005.

CHOI, J.S.; KWON, T.W.; KIM, J.S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. Journal Korea Foods and Biotechnology, Seoul, v.5, n.2, p.167-169. 1996.

CHAI, C.; JU, H.K.; KIM, S.C.; PARK, J.H.; LIM, J.; KWON, S.W.; LEE, J., Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities. J Chromatograf B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 ,Coréia.

CLAVAN, J.K. E KADA, S.S., Nutritional improvement of cereal by fermentation. Crit rev. Food sci Nutr, v. 28, p 349-900, 1989.

COLLA, L.M.; FURLONG, E.B.; COSTA, J.A.V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. Braz. Arch. Biol. Technol., Curitiba, v. 50, n. 1, 2007.

CORREIA, R.T.P.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACÊDO, G.R.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. Process Biochemistry. Natal, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

COSTA, R.P.; MENENDEZ, G.; BRICARELLO, L.P.; ELIAS, M.C.; ITO, M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impacto nos lípides e na arteriosclerose. Ver. Sociedade Cardiológica, São Paulo, 2000.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. 1998. Chemical modification of isoflavone in soyfood during cooking and processing. Am. J. Clin.Nutr.68, 1486-1491.

DENNIS KUNKEL MICROSCOPY, Inc. Fruiting structure (sporangia) of the common bread mold *Rhizopus* DISPONÍVEL <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab10/dkrhiz.html>. Acesso em: 22/02/2012.

DEVI, M.K.A.; GONDI,M.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A.,Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity, Food Chemistry, Volume 114, Issue 3, 1 June 2009, . p.771–776.

DOMINIC ANFITEATRO. Culture-foods of Asia Austrália. 2006. Disponível em: <<http://users.chariot.net.au/~dna/koji.html>>. Acesso em: 12/03/2012.

DU, F.; ZHANG,F.; CHEN, F.; WANG, A.; WANG,Q.; YIN , X.; WANG, S., Advances in microbial heterologous production of flavonoids, African Journal of Microbiology Research,2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. Nature, v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.

DUVAL, B. E ; SHETTY, K. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. Journal of Food Biochemistry, v. 25 n. 5, p. 361-377. 2001.

EL-GINDY, A. A.; IBRAHIM, Z.; ALI U.F.; EL-MAHDY O.M. Extracellular Phytase Production by Solid-state Cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus Niveus* on Cost-effective Medium. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, v. 5, p. 42-62, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção de Soja no Brasil (2004).Disponívelem:<<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção orgânica de citros do Rio Grande do Sul, conceituação dos produtos orgânicos (2007). Disponível

em:<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema_20-ovo/cap2_estado_da_arte_da_producao_organica_de_citros_no_rio_grande_do_sul.htm> Acesso em: 26 abr. 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Modernização da agricultura, expansão da soja no Brasil e as transformações sócioes paciais no paraná, 2000. Disponível em: www.emprapa.br/. Acesso em: 11 dez. 2011. EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Disponível em:< www.cnpuv.embrapa.br >Acesso em 28/07/2012.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Dinâmica das plantas daninhas e prática de manejo- documento 260, 2005.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. New Antioxidant Isolated from Tempeh, J. Agric. Food Chem. Department of Food and Nutrition, Sugiyama Jogakuen University, Japan, 1996.

ESAKI, H.; WATANABE, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative, O-dihydroxisoflavone in soybean fermented with *Aspergillus saito*, Biosci. Biotechnol. Biochem. n. 63, p.851-858, 1999.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T., New Antioxidant Isolated from Tempeh, J. Agric. Food Chem., 1996, v. 44, n. 3, p.696-700, 2001.

ESAKKIRAJ, P.; SANDOVAL, G.; SANKARALINGAM, S.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Preliminary optimization of solid-state phytase production by moderately halophilic *Pseudomonas* AP-MSU 2 isolated from fish intestine. Annals of Microbiology, v. 60, n. 3, p.461-468, 2010.

ESKIN, N.A.M. Biochemistry of Foods. San Diego, CA: Academic Press, p. 401-432, 1990.

ESTEVEES, E.A.; Monteiro, J.B.R. Efeitos benéficos da isoflavona de soja em doenças crônicas, Revista Nutrição, 2001.

EUA - 2008. Soybean Composition and Nutrients. Los Angeles Chinese Learning Center. Disponível em: <http://chinese-school.netfirms.com/otherlinks.html>. Acesso em: 25 abr. 2012.

EVERLEIGH, D.E. The microbiological production of industrial chemicals. Sci American, n. 245, p.155-178, 1981.

FAO. Statistical databases. Disponível em: < <http://www.fao.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

FENG, X.M.; PASSOTH,V.; JONSSON,C.E.; ALMINGER,M.L.; SCHURER,J. *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation-nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics,Sweden, 2007.

FDA - Food and Drug Administration Control of serum lipids with soy protein. approves soy health claim for food labels<http://my.webmd.com/news/531891>. 1999.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D.L. Nutritional and health benefits of soy proteins. Journal of Agriculture and Food Chemistry., v. 49, p.1131-1130, 2001.

FRIEND, B.A.; GIERHART, D.L.; O'BRIEN, J.K., (1987)/4642236, Process for reducing the level of objectionable flavors in vegetable protein by microorganism contact, 1987.

FUKUSHIMA, D.; HASHIMOTO, H. Oriental soybean foods. *In*: Processing of world soybean research conference. Colorado, Westview Press, p.729-734, 1980.

FUKUTAKE, M. TAKAHASHI, M. ISHIDA, K. KAWAMURA,H. SUGIMURA,T. WAKABAYASHI,K., Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products, Food and Chemical Toxicology, Volume 34, Issue 5, May 1996, Pages 457–461.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p-86-93. 2001.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; DEEPAK VERMA,D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE,S.. KHOWALA, S., Fungal biotechnology in food and feed processing, *Food Research International*, 2009.

GLÓRIA, M.B.A.; TAVARES NETO, J.; LABANCA, R.A.; CARVALHO, M.S. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, p. 7480-7485, 2005.

GRAU, H.R.; AIDE, T.M.; GASPARRI, N.I. Globalization and soybean expansion into semiarid ecosystems of Argentina. *Ambio*. v. 34, n. 3, p. 265-266, 2005.

GREENWOOD,S.; BARNES,S.; CLARKSON,T.B.; EDEN.J.; HELFERICH,W.G.; HUGHES,S.; MESSINA,M.; SETCHELL.K.D.R. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of the north American menopause society. *Journal of the North American Menopause Society*, v.7, n.4, p.215-229, 2000.

GROS, J. B. Fermentation media: design and properties, *Advances in Fermentation (Solid –State Fermentation)* Nova Deli: Editora, 2008. 539p.

GRUPTA,R.; SHARMA,M.; LAKSHMY,D. P.; REDDY,K. S. Improved method of total antioxidant assay,Department of cardiac Biochemistry, Department of cardiology, Nova Delli, Indian journal of biochemistry &biophysics, 2008.

GYORGY, P.; ROAD, C.; ROSEMONT, Patente 3681085. Food product containing tempeh, united state patent office, 1972.

HACHMEISTER, K.A.; FUNG, D.Y. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, ed. 19, p.137-188, 1993.

HAMES-KOCABAS, E. E.; UZEL,A. (2007). Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments. *Ann.Microbiol*. v. 57, n. 1, p. 71-75, 2007.

HARON, H.; ISMAIL, A.; AZIAN, A.; SHAHAR, S.; PENG L.S. Dadzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. Food Chemistry, Malásia, n.115, p.1350-1356, 2009.

HASLER, C. M. 1998. Functional Foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. Food Technology, n. 52, p. 63-70, 1998.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Analytical Biochemistry, v.113, p.313-317, 1981.

HERING, L.; BISPING, B.; REHNM, H.J. Patterns and formation of fatty acids at tempe fermentation by several strains of 2 *Rhizopus* sp. Fat Science Technology. v. 8, p. 303–308, 2000.

HESELTIME, C. W. E SMITH, M.L. Patente 3243301. Cereal-containing varieties of tempeh and process therefor, united state patent office, 1966.

HESELTIME, C. W. Tempeh: A mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. Critical Reviews in Microbiology. Chapter 19, p.137–188, 1983.

HESELTIME, C.W. A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologia v. 57, p.149-197, 1965.

HESELTIME, C.W.; SMITH, M.; BRADLE, B.; DJIEN, K. S. Investigations of tempeh, an Indonesian food. Dev. Ind. Microbiol. v. 4, p. 275- 287, 1963.

HIROTA, A.; TAHI, S.; KAWAIL, S.; YANO, M.; ABE, N. 1,1-Diphenil-2-picrilhydrazyl Radical-scavenging Compounds from Soybean Miso and Antiproliferative Activity of Isoflavones from soybean Miso toward the Cancer cell lines. Biosci. Biotechnol. Biochem. p.1038-1040, 2000.

HO, C.T. Phenolic Compounds in Food, an overview. University of New Jersey, 1992.

HOLKER,T.M.; ALPERIN,M.J.; ALBERT,D.B.; MARTENS,C.S. Field and laboratory studies of methane oxidation an anoxic marine sediment ± evidence for methanogen - sulphate reducer consortium. Global biochemical cycle, n. 8, p.451-463, 1994.

HORAN, F. E. Soy protein products and their production. Journal of the American Oil Chemists Society, Champaign, v.51, n.1, p.67a-73a, 1974.

HUANG, Y. Effects of natto-temph on gene expression of antioxidant enzymes and angiotensin converting enzyme in Wistar Kyoto Rats. Tese de doutorado. Department Food and Nutrition, 2008,. China.

HUANG,Y.H.; LAI, Y.J.; CHOU, C. C. Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product ofsoybean, Journal of Biocience and Bioengeenier, 2011.

HUTABARAT, L.S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, H. (2001). Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. Journal of Food Composition and Analyses. n.14, p. 43–58, 2011.

IKASARI, I. E.; MITCHELL D. A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology Curitiba, 1996.

IMANDI, S.B.; KARANAM,S.K.; GARAPATI,H.R., Optimization of Process Parameters for the Productionof Lipase in Solid State Fermentation by Yarrowia Lipolytica from Niger Seed Oil Cake (*Guizotia Abyssinica*), Journal of Microbial & Biochemical Technology, Center for Biotechnology, Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Andhra University, Visakhapatnam-530 003, India,2010.

IRFAN, M.; RAUF, A.; SYED, Q.; NADEEN M.; BAIG,S. Exploitation of Different Agro-residues for Acid protease Production by *Rhizopus* sp. Koji Fermentation. Food & Biotechnology Research Center (FBRC). Pakistan Council of Scientific & Industrial, 2011.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of the National Cancer Institute, Cary, v. 70, n.2, p. 343–347, 1983.

JOANNOU, G.E. Patente 7056952. Isoflavone metabolites, United States Patent, 2009.

KAGAWA, A. Standard table of food composition. Japan. Tokyo: University of Nutrition for women. p.104-105, 1995.

KATO, E. E.; TAKITA, M. Patente 82088. Fermented food, 2007.

KENT, N.L., Technology of cereals- with special reference to wheat. 2. ed. Grã Bretania, 1975.

KEUTH, S.; BISPING, B. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempeh solid substrate fermentation. Journal of Applied Bacteriology, v. 75, p. 427–434, 1993.

KIERS, J.L.; NOUT, M.J.R.; ROMBOUTS, F.M. Patente 0166198, Process for the manufacture of a fermented health-promoting product, 2004.

KOLODZIE, J. H. ; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells". Phytochemistry. v. 66, n. 17, p. 2056–2071, 2005.

KONOVSKY, J; LUMPKIN, T. Edamame production and use: a global perspective. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION. Program and abstracts. Gongzhuling: Jilin Academy of Agricultural Science, 1990.

KROYER G. AND HEGEDUS N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innovat Food Sci Emerg Tech. n.2, p.171–174, 2001.

KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST S. H. FRANÇA NETO, J.B. Influência do conteúdo de isoflavonas sobre a qualidade fisiológica da sementes de soja. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7. Anais Londrina: Embrapa - CNPSo, 2001, p.47.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de Doutorado: ESALQ, 140 p., 2007.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D.; BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Research International*, v. 43, p. 323–328, 2010.

KURZER, M.S. ; XU, X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr.* v.17, p.353-81, 1997.

KWAK, C. S.; LEE, M. S.; PARK, S.C. Higher antioxidant properties of chungkookjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylaglycone isoflavone during fermentation. *Nutrition Research.* n.27, p. 719-727, 2007.

LAI, L S.; CHOU, T.; CHAO, W. W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 2, p. 963–968, 2001.

LARREA L. ; MOHAN, A.;PAGANGA,G.; MILLER,N. BOLWELL. Antioxidaant activity phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Res.* n.26, p.63-70, 1997.

LATEEF, A.; OLOKE,J.K. ; GUEGUIM KANA, E.B. ;OYENIYI, S.O. ; ONIFADE, O.R.; OYELEYE,A.O. ; OLADOSU,O.C. ; OYELAMI,A.O. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 24, pp. 2369–2374 Nigéria, 2008.

LEAL, P. F.; BRAGA, M.E.M.;SATO, D.N.; CARVALHO,J.E. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Campinas, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LEE, Y,L; YANG,J.Y; MAU J.L. Antioxidant proprieties of water extracts from monascus fermented soybeans. *Food Chemistry* , Taiwan, 2008.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LEÓN, J.A.R.; SOCCOL, C.R.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A.; STURN,W.; LETTI, L.A.J.; VANDENBERGHE, L.P.S.; FERNANDEZ, D.E. Solid state fermentation. Nova Deli: Editora, 2008. 539p.

LIN, C.; WEI, Y.; YU, R.; CHOU,C. Cultivation Temperature and Length Affect the Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Soybean Koji Prepared with *Aspergillus awamori*, Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 14, n. 1, p. 74-79, 2006.

LISBETH, A. PACHECO-PALENCIA , SUSANNE U. MERTENS-TALCOTT, RIOS,J.; PETRA JILMA-STOHLAWETZ,P.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S.T. ; DERENDORF, H., Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea*Mart.) in Human Healthy Volunteers, *J. Agric. Food Chem.*, 2008.

LIU, B. L., RAFIQ, A., TZENG, Y. M. AND ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.* V.22, p. 415–424, 1998.

LÜ L, LIU SW, JIANG SB, WU SG (2004). Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41". *Acta Pharmacol. Sin.* 25 (2): 213–8.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v. 25, n. 3. p. 429-438, 2002.

MADSEN, H.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts. ACS Symposium Series 660. American Chemical Society, Washington, DC. Chapter 14, p.176-187,1997.

MARTINS,C.A.O.; SEDIYAMA,C.S.; MOREIRA,M.A.; REIS,M.S.; ROCHA,V.S.; OLIVEIRA,M.G.A.Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre as características agrônômicas da soja, Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 37, n. 10, p. 1389-1398, 2002.

MATAR, C. E MARTIN,L. J. Patente 0031517. Antioxidant producing bacterium and uses thereof, 2007.

MATAR, C. E. ; HADDAD,P.S. Patente 0092583, Antioxidant producing bacterium and uses thereof in the treatment and prevention of diabetes and obesity, 2010.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Conteúdo de Miricetina, Quercetina e Caempferol em chás comercializados no Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP: v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006.

MATSUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N; UEDA, S. Hidrolisys of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *rhaminosus*. IFO 3425. Journal of Fermentation Bioengineering, n.74 , p.301-304, 1994.

MEDWID, R.D.; GRANT, W. Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. Applied and Enuironmental Microbiology, v. 48, p.1067-1071, 1984.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas,SP, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, E.; MACIEL, M.; LIMA, V.; LEAL, F.; CAETANO, A.; NASCIMENTO, R. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MESSIMA, M.J.(1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.70, p.439 -450, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* v. 31, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry, Oxon*, v. 82, n. 3, p. 409-416, 2003.

MONAJJEMI, M. ; AMININ, A.L.N.; ILKHANI, A.R.; MOLLAAMIN, F. Nano study of antioxidant activities of fermented soy whey prepared with lactic acid bacteria and kefir. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 2, p. 426-430, 2012.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L.; AMABILE, R.F. Histórico da soja. *In: MORAIS, A.A.C., SILVA, A. L. (Ed.). Soja: suas aplicações*. Rio de Janeiro: MEDSI, p.1-12, 1996.

MURPHY, P.A. Phitoestrogen content processed soybean products. *Food Technol.* n. 36, p. 60-64, 1982.

NACZK, M.; SHAIDI, F. Phenolic in cereal, fruits and vegetables: occurrence, extract and analyses. *Journal of pharmaceutical and biomedical analyses*, v.41, n.5, p.1523-1542, 2006.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKA, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity, *Journal Agric. Food Chemistry*, n.22, p.806-810, 1974.

NAIR, V. Patente 0004334 Dietary nutritional supplements for health care, 2009.

NAKAJIMA, N.; NOZAKI, N.; ISHIHARA, K.; ISHIKAWA, A.; TSUJI, H. Analysis of isoflavone content in Tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. Journal of Bioscience and Bioengineering, ed. 100, p.685-687, 2005.

NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagens in food. Journal of Nutrition, v.29, p.273-300, 1990.

NEGI S.; BENERJEE R, Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. Food Technol Biotechnol 44:257–261 (2006).

NOUT M.J.R. ; LAARHOVEN,T.M.G.B.A.; JONGH,P.; KOSTER,P.G. Ergosterol content *rhizopus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates, Applid microbiology Biotechnology- Netherlands, 1987.

NOUT, M.J.R. Effect of *Rhizopus* and *Neurospora* spp. on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and accumulation of aflatoxin B1 in groundnut. Mycological Research, v. 93, p. 518-523, 1989.

NOUT, M.J.R.; KIERS, J.L. Tempeh fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. Journal of Applied Microbiology, Chapter 98, p. 789-805, 2005.

NÚÑEZ SELLÉS,A.J., Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades, Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba, 2005.

OGAWA A, YASUHARA A, TANAKA T, SAKIYAMA T AND NAKANISHI K, Production of neutral protease by membrane-surfaceliquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM 2704. J Ferment Bioeng 80:35–40, 1995.

OHR, L. M.. A growing arsenal against cancer. Food Technology, v. 56, n. 7, 67-71, 2002.

OKAMOTO, A.; HANAGATA, H.; KAWAMURA, Y.; YANAGIDA F. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Human Nutrition*, v. 47, p. 39, 1995.

OLIVEIRA, J.E.D. Valor da soja como alimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. *A Soja no Brasil*. ITAL, Campinas/SP, p.820-823, 1981.

OLTHOF, M.R, HOLLMAN, P.C. ; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* v. 131, n.1, p. 66–71, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. *Solidstate fermentation in biotechnology*. New Delhi: Asiatech Publishers Inc: Phytase production can be induced by various cereal grains, bran, seeds or seed meals, 2001.

PANDEY, A. Solid state fermentation, *Biochemistry Eng. J.* n.113, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R., *Fermentation Technology*, Dussap. Asiatech Publishers, New Delhi, 2008.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, 2000

PARANÁ. SEAB. Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Ata da XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/>. Acesso em: 11 dez. 2011.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 4, n.20, p.12-14, 2001.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja Brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.3, n.3, p. 156-160, 2001.

PARK,C.H. Patente 39723, Fermented drink containing high level of natural antioxidants, octacosanol, and beta-glucan and its method of production, 2003.

PELCZAR, M.J.; CHAN,E.C.S.; KRIEG, N.R., EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M. F. Microbiologia, conceitos e aplicações, v.I, 2. ed., Makron books, São Paulo, p.1-2, 1996.

PEREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, F. B., Soja, alimento e saúde: valornutricional e preparo. Viçosa: UFV. 102 p. 2004.

POMPEU, D.R. Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: Ministério da Agricultura/AGIPLAN, 1985. 289p.

PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. *In*: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M.T. Phenolic compounds in food and their effects on health. Washington. American Chemical Society, 1992. p.54-71. (ACS Symposium Series, n.507).

PRATT,D.E; BIRAC,P.M. Source of Antioxidant Activity of Soybeans and Soy Products – Journal of Food Science, 1979.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.46, n. 7, p. 2686-2693, 1988.

RAGOT, E. A saúde pelos cereais 9-74p. Litexa Portugal, Lisboa, 1985.

RAIMBAULT, M., General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Montpellier (France),1998.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K. M. ; SZAKACS, G. ; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. Using oilcakes as substrates, Process biochemistry. Budapeste, Hungria: InChief, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, J.; Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos (Antioxidants used in oils, fats and fatty foods). Quím. Nova. v.29, n.4 São Paulo, jul./ago. 2006.

RANDHIR, R.; SHETTY, K. Mung beans by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. Inovative Food Science Emerging Technologies, p.197-204, 2007.

RE,R.; PELLEGRINI,N; PROTEGGENTE,A.; PANNALA,A.; YANG,M.; RICE-EVANS,C. Antioxidant actiivity applying na improved abts radical cation decolorization assay, Free Radical Biology & Medicine, 1988.

RECHNER, A.R.; SPENCER, J.P.E.; KUHLE, G.; HAHN, U.; RICE-EVANS, C.A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. Free Radical Biology and Medicine, 30, 1213-1222, 2001.

REVISTA ÉPOCA. De olho no Cerrado – Ciencia e Tecnologia. Edição 12. 10/08/1998.

RHODES, M. J. C. Physiologically-active compounds in plant food: an overview. Proceedings of the Nutrition Society, Cambridge, v. 55, n. 1B, p. 371–384, 1996.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. Digestive and Liver Disease, v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

RODRIGUES-LEON, J.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Factors Affecting Solid-state Fermentation, 2008

RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tirosine ammonia-liase. Plant Physiology, v. 113, p. 175-179, 1997.

RUZICKA,S.; EDGERTON,D. ; NORMAN, M.; HILL,T., The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils, Department of Environmental Sciences, University of East London, Romford Road, Soil Biology & Biochemistry, London, 2000.

SABU, A.; SARITA, S.; PANDEY, A.; BOGAR, B.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R. , (2002) Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 102-103, N.1-6, p.251-260. 2002.

SAIGA, T.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. (2003) Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatments. J. Agric. Food. Chem. n. 51, p. 3661-3667, 2003.

SALMON, D.N.; PIVA, L.C.; BINATI, R.L.; VANDENBERGHE; L.P.S.; SOCCOL; V.T.; SOCCOL; C.R.; SPIER, M. R., Formulated products containing a new phytase from *Schyzophyllum* sp. phytase for application in feed and food processing, Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, 2011.

SAMSON, R. A.; KOOLI, J. A. V. ; BOER, E.D. Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands. Journal of Food Protection, v.50, p. 92-94, 1987.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.76, p.270-276, 1998.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E., BURROUGHS, R.; SAUER, D. B.; HUBBARD, J. D. Ergosterol as a Measure of fungal growth. Phytopathology, Saint Paul, v. 69, n.11, p. 1202-1203, Agricultural Research, U.S. Department of Agriculture, Manhattan, 1979.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. Cereal Chem., v.54, n.6, p.1207-1217, 1977.

SELLA S.R., GUIZELINI B.P., VANDENBERGHE L.P., MEDEIROS A.B., SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 2009

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J. Nutr., v. 129, p. 758S-767S., 1999.

SHARMA, R.; SARBHOY, A. K. Tempeh - a fermented food from soybean. **Current Science**, chapter 53, p. 325-326, 1984.

SHURTLEFF, W. ; AOYAGI, A. Tempeh production. v. II. London, Ed. Professional, 1950.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. (1950). Tofu and soymilk production: the book of tofu. 2nd ed. Lafayette: Soya Food Center, 1990, v.2, 336p.

SIMIC, G.S.; JOVANOVIĆ¹, S.V. – ANTIOXIDANT IN NUTRITION, Annals of the New York Academy , 1994

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult. v.16, p.144-158, 1965.

SMITH, T. A. Amines in food. Food Chemistry, v. 6, p. 169-200, 1980.

SMITH, D., ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew: CAB International Mycological Institute, 1983. 51p.

SOCCOL, C. R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomycetozóitos do gênero *Pleurotus*. Tese (Professor Titular), 1994. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 228 p.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, 2003.

SOCCOL C.R., (1992) Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, p. 218.

SOCCOL, C.R.; PRADO, F.C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. In: Encyclopaedia on Bioresource Technology. New York: Haworth Press, 2002.

SONATI, J. G. ; AFFONSO, C. V de. Alimentos funcionais e seus benefícios à saúde das populações. *In:Qualidade de Vida e Novas tecnologias*. Qualidade de vida e novas tecnologias. Campinas, SP: Ipês, 2007.

SORENSEN, W.G.; HESSELTINE, C.W. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia*, v. 58, p.681-689, 1966.

SOUZA, M. C. M. Produtos Orgânicos. In: ZULBERSZTJN, D.; NEVES, M. F. (Org.). Economia e gestão de negócios agroalimentares. São Paulo: Pioneira, 2000. p. 385-400.

SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C., Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola* Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GREINER, R.; SOCCOL, C. R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. *Chemical Engineering Communications*, v. 198, p. 286 – 297, 2011.

SPIER, M. R., GREINER, R., RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., PANDEY, A., SOCCOL, V. T. AND SOCCOL, C.R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agro-industry in SSF by fungal isolates. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 46, p. 178-182, 2008.

STEINKRAUS, K .H.; CULLEN, R.E.; PEDERSON, C. S.; NELLIS, L. F.; GAVITT, B. K. (1983). Indonesian tempeh and related fermentations. *In: HANDBOOK of indigenous fermented foods*. Edited by K.H. Steinkraus, R.E. Cullen, C.S. Pederson, L.F. Nellis & B.K. Gavitt. New York: Marcel Dekker, 1983, p. 1-94.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, v. 260, p. 214-216, 1993.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORN, J.B. (Ed.), *Plant Biochemistry*. Academic Press: London, p. 387-416, 1997.

STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, v. 54, p. 460-470, 1991.

SUDARMADJI, S. Certain chemical and nutritional aspects of soybean tempe. Ph.D. Thesis, Michigan State University, Michigan, 1975.

SUPARMO, R. Vitamin B12 formation in tempeh fermented by mixed-culture. Ph.D. Thesis, Michigan State University. *Dissertation Abstracts International* B49, 1988.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food. Agric.*, v.10, p.63-68, 1958.

SWAN, K.O.D.; HESSELTINE, C.W. Tempeh and related foods. *Economic Microbiology*, Chapter 4, p. 115-140, 1979.

TAIZ, I.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 4. ed. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 794 p., 2006.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKOSHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. ah-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Proceedings of the Indian National Science Academy: Biological sciences*, Volume 65 Japão, 1989.

TAVARES, S.G.; KIYAN, C. Avaliação da qualidade nutricional da proteína de farinha de tempeh, produto fermentado, obtido a partir da soja. *Alim. Nut.* São Paulo, 2002.

TECHNO IN HOME. Disponível em: <<http://namnack.blogspot.com/>>. Acesso em: 12/03/2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in

isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 43, p.1184 -1192, 1995.

TYUG, T.S.; PRASAD,K.N.; ISMAIL,A., Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by products, *Journal of Food Chemistry*, Malasia, 2010.

USDA – Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Food, Nutrient data Laboratory, Agriculture Research Service, 1999.

VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food-grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, n. 39, p. 1939-1946, 2004.

VELHO, N. A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento da soja na ESALQ – USP. Simpósio sobre a cultura e produtividade da soja, 1991. Piracicaba: Anais da FEALQ, Piracicaba/SP, p. 60-81, 1992.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W.; JOHNSON, T. S. Applications of Plant Metabolic Engineering. Netherlands: Springer, 2007. 332p.

WAGENKNECHT, A.C.(1961). Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. *J.Food Sci.* v.26, p. 373-376.

WAINWRIGHT, M. An introduction to fungal Biotechnology, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK.1992

WANG, D.; WANG, L.; ZHU, F.; ZHU, J.; CHEN, X. D.; ZOU, L.; SAITO, M. ; LI, L. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of douche (a traditional Chinese salt-fermented soybean food), *Food chemistry*, Volume 107, Issue 4, 15 April 2008, Pages 1421–1428 China, 2007.

WANG, H. L.; HESSELTINE, C. W. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oZigosporus*. *Can. J. Microbiol.* v.11, p. 727 -732, 1965.

WANG, H. L.; VESPA, J. B.; HESSELTINE, C. W. Acid Protease Production by Fungi Used in Soybean Food Fermentation, Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S, Applied Microbiology. 1974.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WARD, O. P. Biotecnologia de la fermentacion. Zaragoza: Acribia. 1989.

WEYMAN

WIESEL, I.; REHM, H. J.; BISPING, B. Improvement of tempeh fermentations by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp. and bacterial strains. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 47, p. 218-225, 1997.

WILDMAN, R.E.C. (Ed). Handbook of nutraceuticals and functional foods. Boca Raton: CRC Press, 2001.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci., USA, n. 95, p.6578-6583, 1998.

WOLF, W. D.; COWAN, J. C. Soybean as a protein source. London: Butterworth, 1971. 150 p.

XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical Characterization of a Prokaryotic Phenylalanine ammonia lyase. Journal of Bacteriology, v. 187, p. 4286-4289, 2005.

YANG, H.J.; PARK,S.; PARK,V.; CHUNG,K.R.; KWON,D.Y. - Fermented soybean products and their bioactive compounds, Republica da Coreia –Uzbekistan,2009.

YAO, Q. ; XIAO-NAN, J. ; DONG, P. H. Comparison of Antioxidant Activities in Black Soybean Preparations Fermented with Various Microorganisms, Agricultural Science in China, Department of Food Science and Technology Korea, 2010.

ZHANG, Z.; LU,G.; PAN,H.; FAN, L.; SOCCOL,C.R.;PANDEY,A., Production of Powerful Antioxidant Supplements via Solid-State Fermentation of Wheat (*Triticum*

aestivum Linn.), by *Cordyceps militaris*, Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou, ZJ 310021, PR China (FTB-2689), 2012.

ZILLIKEN, F. W. Patente 4366248. Fermentation method of preparing antioxidants, 1982.

ZILLIKEN, F. W. Patente 4232122. Antioxidants, antioxidant compositions and methods of preparing and using same, 1980.

ZILLIKEN, F. W. Patente 4264509. Isoflavones and related compounds, methods of preparing and using and antioxidant compositions containing same, 1982.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Análises Estatísticas

Tabela I. Efeitos estimados ($R^2 = 0,9131$; $R^2_{adj.} = 0,8262$)

Variável	Efeito	P (erro)	Coef
Mean/Int	57,71429*	0,000266*	57,71429
Amostra	42,50000*	0,011172*	21,2500
Tempo de extração	0,500000	0,951495	0,2500
1 by 2	0,00000	1,000000	0,0000

*diferença estatisticamente significativa

Tabela II. Efeitos estimados ($R^2 = 0.9131$; $R^2_{adj.} = 0.8262$)

Variável	Efeito	P (erro)
Mean/Int	57,71429*	0,000266*
Amostra	42,50000*	0,011172*
Tempo de extração	0,500000	0,951495
1 by 2	0,00000	1,000000

*diferença estatisticamente significativa

Tabela III. Resultados da análise de variância (ANOVA)

Variável	SS	df	MS	F	p
Amostra	1806,250	1	1806,250	31,51745	0,011172*
Tempo	0,250	1	0,250	0,00436	0,951495
1 x 2	0,000	1	0,000	0,00000	1,000000
Erro	171,929	3	57,310		
Total SS	1978,429	6			

*diferença estatisticamente significativa

Tabela IV. Resultados estatísticos (ANOVA) da comparação dos dados obtidos (IC₅₀: mg/mL) nas cinéticas de fermentação de soja e fermentação com soja + arroz.

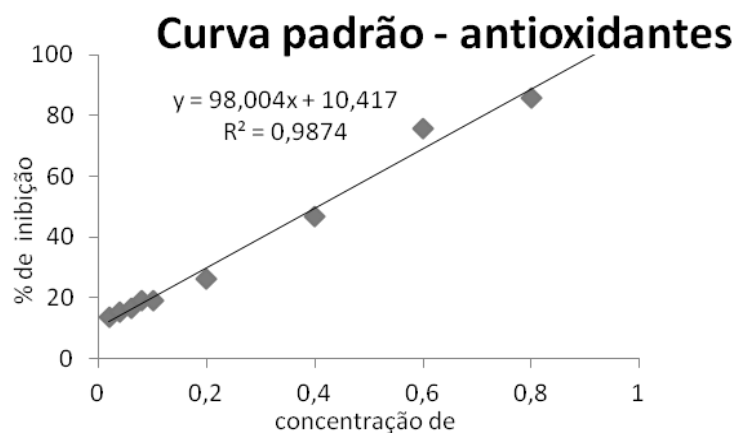
	S+Al-álcool			S+Al-água			soja-álcool		soja -agua	
	media	desvio		media	desvio		media	desvio	media	desvio
oh	81,95	4,52 ^a		168,65	4,05 ^a		87,97	2,77 ^a	191,64	5,32 ^a
16h	92,81	5,28 ^a		127,29	1,19 ^b		93,69	2,21 ^{ab}	329,30	84,89 ^b
24h	76,02	4,87 ^b		63,44	0,61 ^c		100,78	2,35 ^b	248,68	24,70 ^{bc}
36h	46,38	3,39 ^c		48,91	0,62 ^d		69,61	1,28 ^c	189,59	14,69 ^c
48h	39,98	2,49 ^c		59,53	1,29 ^e		48,99	3,21 ^d	76,99	5,35 ^d
60h	29,61	1,63 ^c		55,51	0,64 ^f		56,01	3,85 ^d	47,04	4,58 ^d
72h	6,16	10,64 ^d		56,23	3,45 ^f		44,12	8,25 ^e	54,55	6,63 ^d

*as mesmas letras correspondem aos dados que não apresentam diferença estatisticamente significativa ao nível de significância de 95% entre as amostras, e letra diferente apresenta diferença significativa ao nível de significância de 95% entre os resultados. Resultados estão expressos em média de IC₅₀ mg/mL ± desvio padrão.

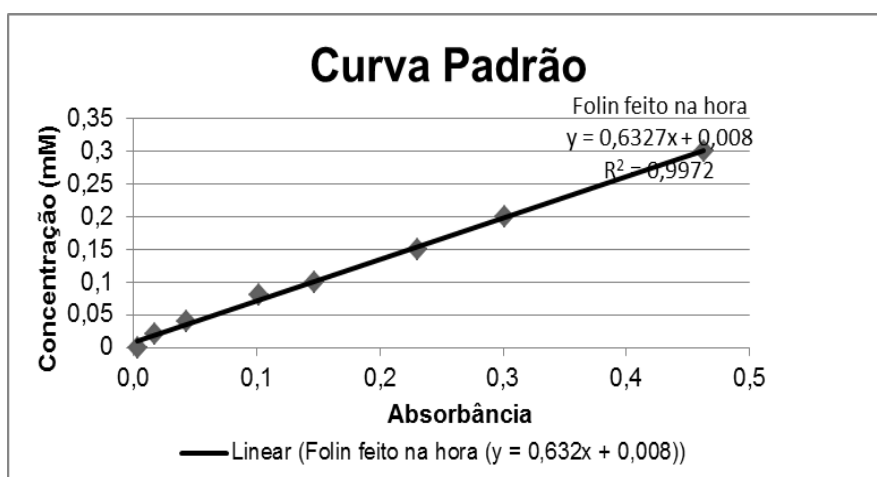
Apêndice 2 – Curvas Padrões

Curva padrão antioxidantes

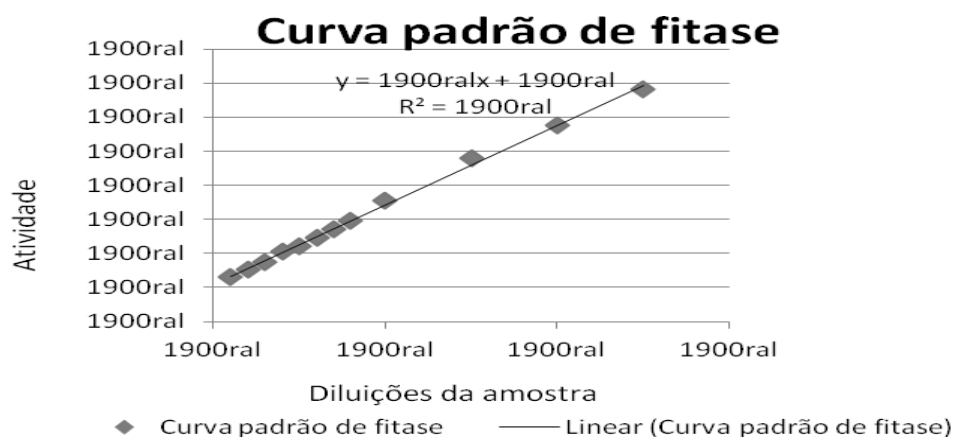
DPPH



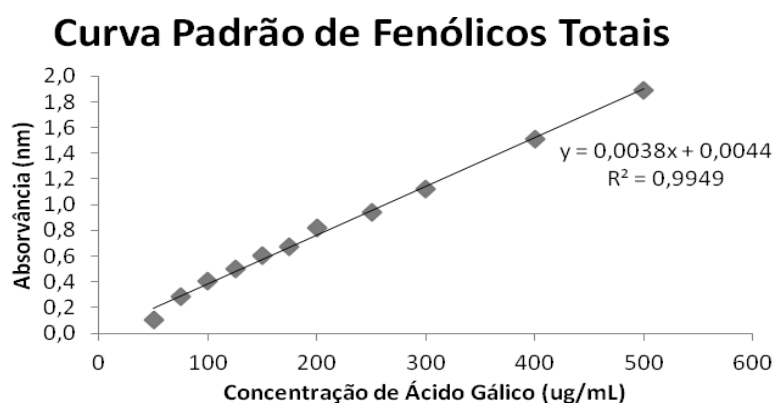
Curva padrão proteases



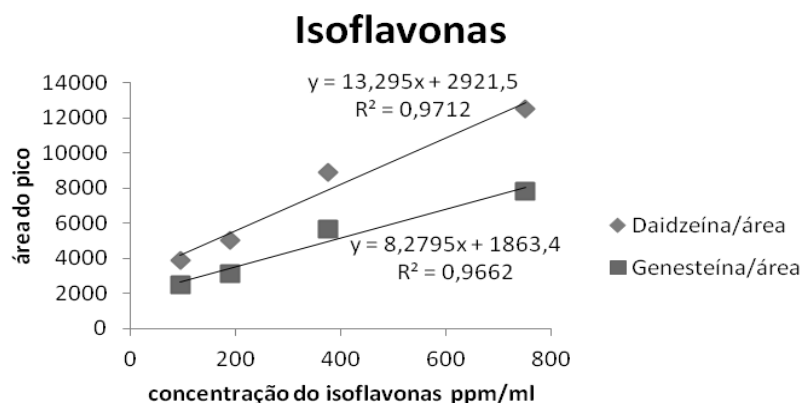
Curva padrão fitase



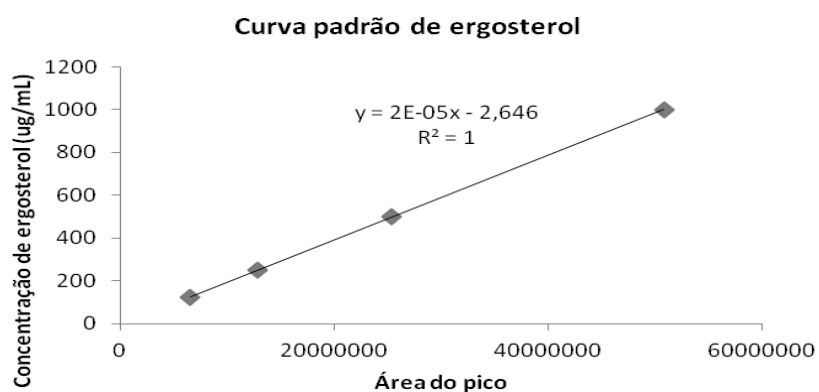
Curva padrão fenólicos totais



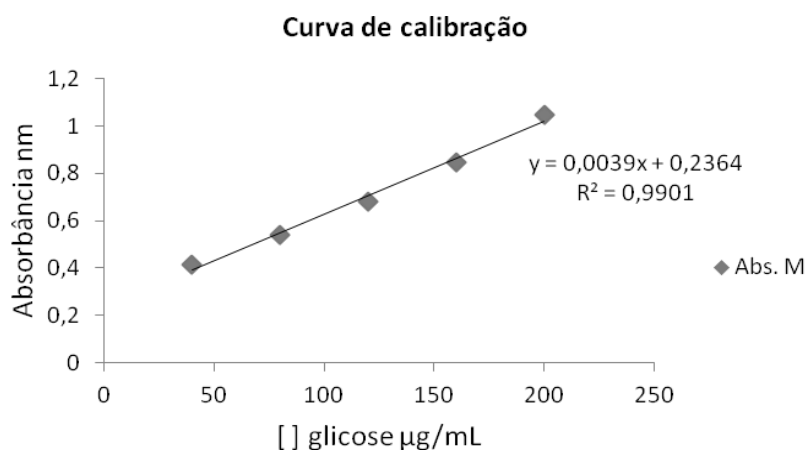
Curva padrão de isoflavonas (daidzeína e genisteína)



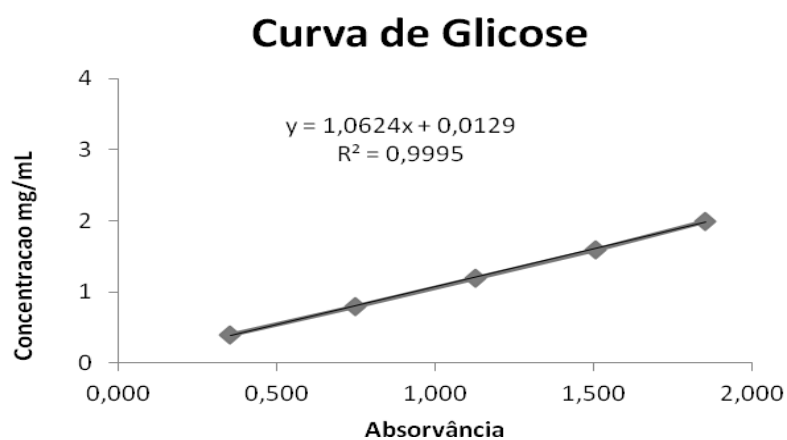
Curva padrão ergosterol



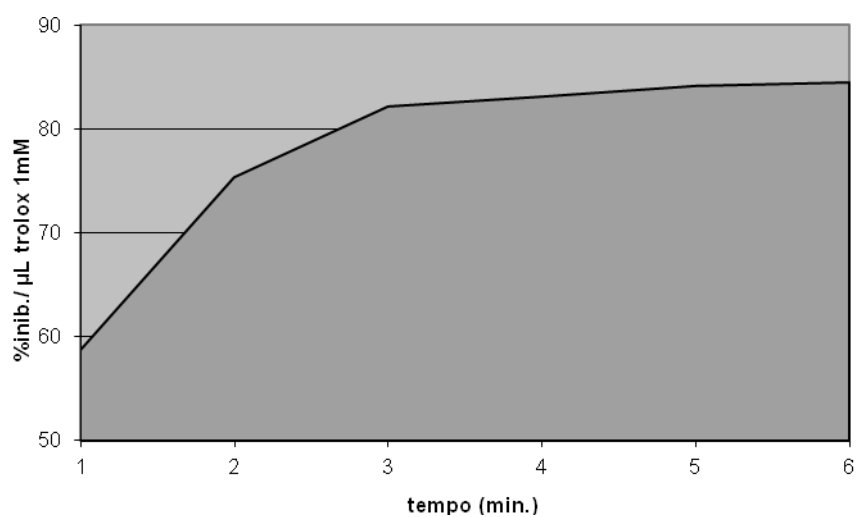
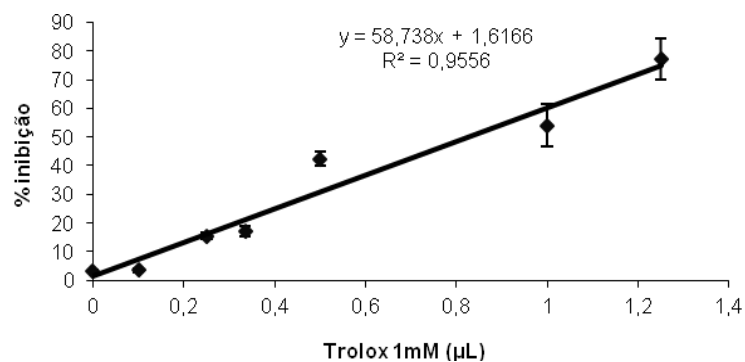
Curva padrão açúcares totais pelo método fenol sulfúrico



Curva padrão dos açúcares redutores



Curva padrão de ABTS



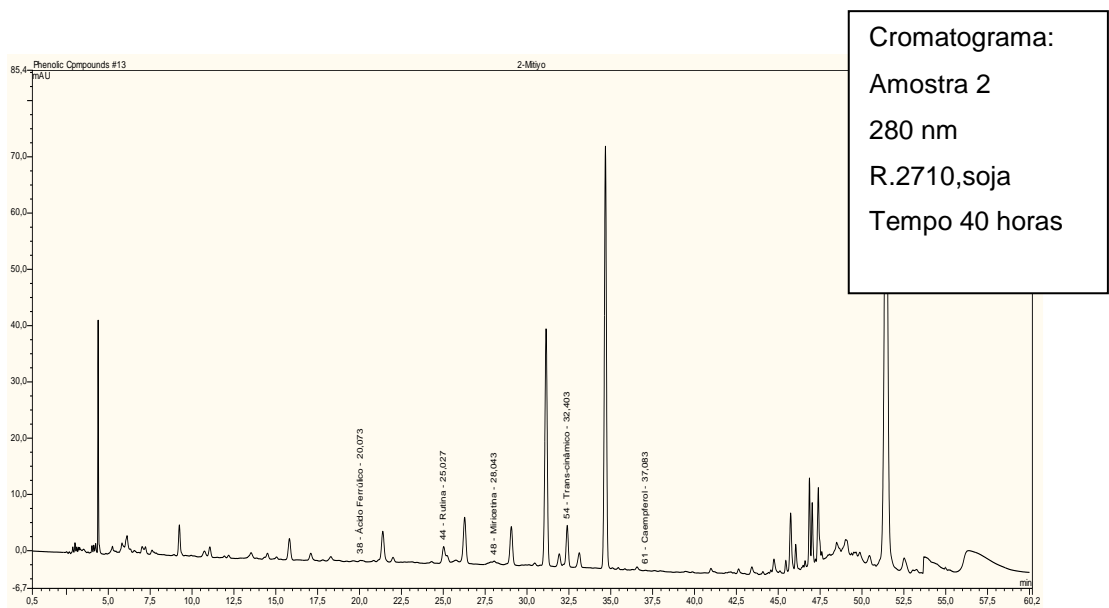
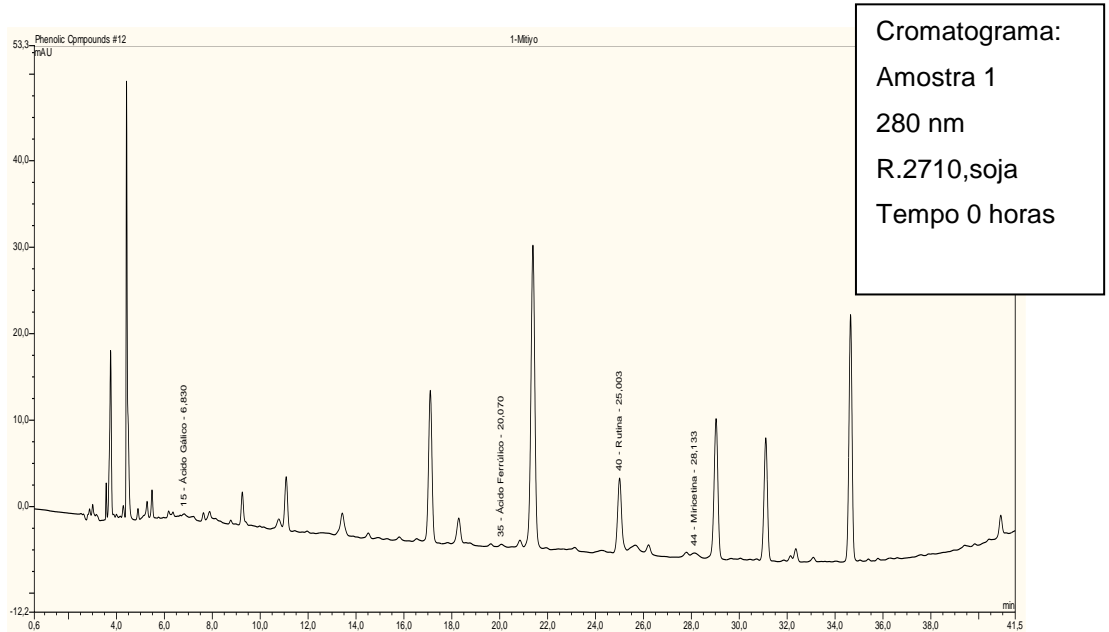
Area total da curva padrão do TEAC: 396,4745

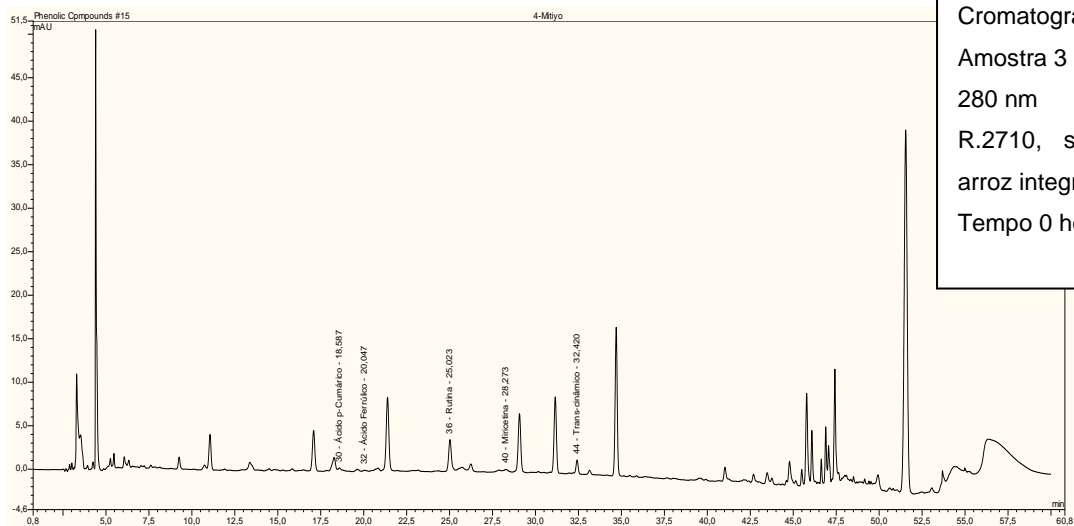
Tabela V. Atividade antioxidante analisado pelo método de ABTS

	S+Al -etanol	S+Al- água	S- etanol	S- água
Tempo (h)	TEAC (µmol)	TEAC (µmol)	TEAC (µmol)	TEAC (µmol)
0	0,178	0,518	0,574	0,589
24	0,757	0,845	0,656	0,915
40	0,885	1,130	0,999	1,048
48	0,742	0,938	0,779	0,987
72	0,607	0,964	0,875	0,435

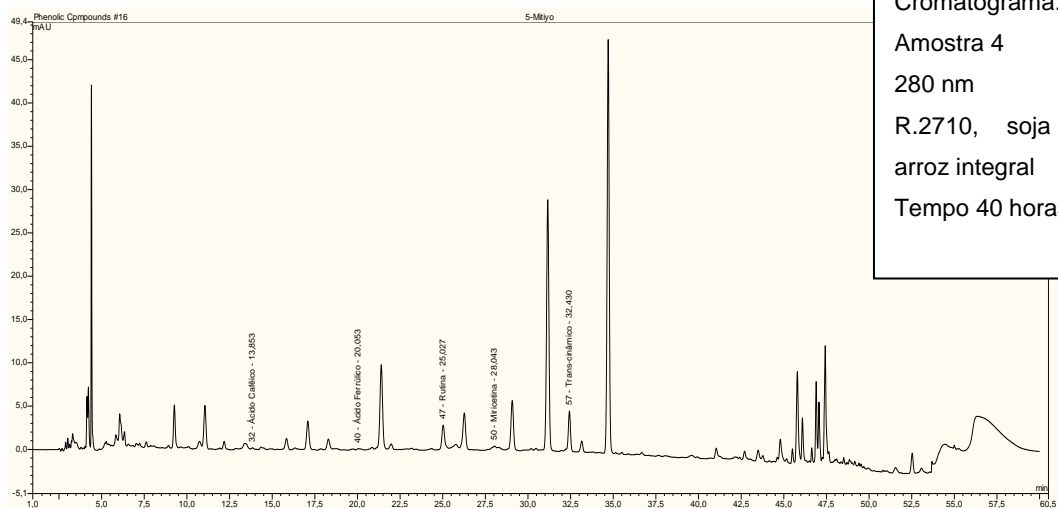
Obs: TEAC(µmol trolox/g de fermentado na base seca)

Apêndice 3 – Cromatogramas das análises em HPLC (identificação e quantificação de antioxidantes)

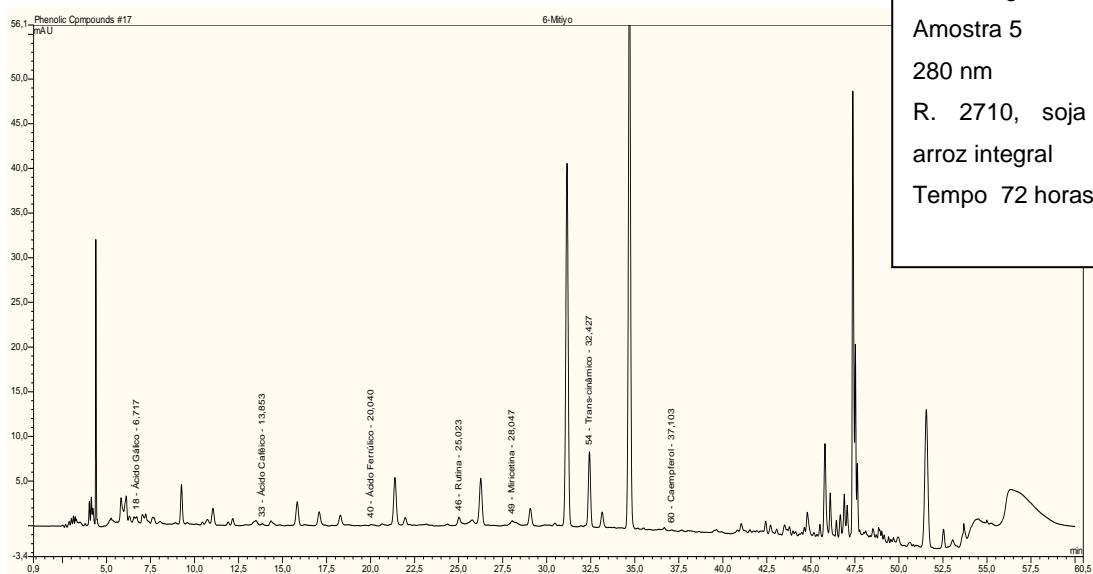




Cromatograma:
Amostra 3
280 nm
R.2710, soja e
arroz integral
Tempo 0 horas



Cromatograma:
Amostra 4
280 nm
R.2710, soja e
arroz integral
Tempo 40 horas



Cromatograma:
Amostra 5
280 nm
R. 2710, soja e
arroz integral
Tempo 72 horas

